

**Methode zur Bestimmung der RNA-Synthese
im embryonalen Säugetiergewebe in-vivo
und Untersuchungen unter dem Einfluß von
6-Mercaptopurin und Cytosinarabinosid**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Mewes
aus Berlin

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550805_0004

Methode zur Bestimmung der RNA-Synthese
im embryonalen Säugetiergewebe in-vivo
und Untersuchungen unter dem Einfluß von
6-Mercaptopurin und Cytosinarabinosid

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Mewes
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. D. Neubert

Korreferent: Prof. Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 7.2.1972



Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

INHALTSVERZEICHNIS

=====

1.	Vorwort
1.1.	Einleitung
1.2.	Datierung der Schwangerschaft
1.3.	Prinzip der Markierung
1.4.	Laugen-Säuren-Fraktionierung (Überblick)
2.	Methodik
	=====
2.1.	<u>RNA-Gewinnung</u>
2.1.1.	Homogenat
2.1.2.	Homogenat-Fraktionierung
2.1.3.	Phenol-Extraktion
2.1.4.	DNAase-Behandlung
2.1.5.	Reinheit der RNA
2.1.6.	Saccharose-Gradienten-Zentrifugation
2.1.7.	Reproduzierbarkeit der Gradienten
2.2.	<u>Nucleotide</u>
2.2.1.	Hydrolyse
2.2.2.	Entsalzung
2.2.3.	Elektrophorese
2.2.4.	Elution
2.2.5.	Aktivitätsmessung
2.3.	<u>Basen</u>
2.3.1.	Hydrolyse
2.3.2.	DC-Trennung
2.3.3.	Elution
2.3.4.	Aktivitätsmessung (OMNIGUARD)
2.4.	<u>Chromatogramm-Spektralphotometer</u>
2.4.1.1.	<u>Einleitung</u>
2.4.1.2.	Elution
2.4.2.	Gerätebeschreibung
2.4.3.	Kurvenflächenauswertung
2.4.3.1.	Kubelka-Munk-Funktion
2.4.3.2.	Andere Verfahren
2.4.4.	Reproduzierbarkeit
2.4.4.1.	Punkt- oder strichförmiger Auftrag
2.4.4.2.	Microcaps
2.4.4.3.	Plattenvergleich
2.4.5.	Abhängigkeit Konz./Fläche
2.4.5.1.	Spaltabmessungen
2.4.6.	Rechnerische Korrektur der Basislinie
2.4.7.	Beispiel (Molverhältnis)
2.4.8.	Zusammenfassung
2.5.	Zusammenfassung (Methode + Fehlerbetrachtung)

- 3. Ergebnisse und Diskussion
=====
- 3.1. Einleitung
- 3.2. 6-Mercaptopurin
 - 3.2.1. Vorversuche
 - 3.2.1.1. Dosis und Zeitpunkt
 - 3.2.1.2. Verteilung (^{35}S -6-MP)
 - 3.2.2. Begleitende Kontrollbestimmungen Tag 11
 - 3.2.2.1. Serum
 - 3.2.2.2. Laugen-Säuren-Fraktionierung
 - 3.2.3. Hauptversuch
 - 3.2.3.1. Nucleotide
 - 3.2.4. Begleitende Kontrollbestimmungen Tag 12
 - 3.2.4.1. Serum
 - 3.2.4.2. Fruchtwasser
 - 3.2.4.3. Laugen-Säuren-Fraktionierung
 - 3.2.5. Hauptversuch
 - 3.2.5.1. Nucleotide
 - 3.2.5.2. Basen
 - 3.2.6. Zusammenfassung
 - 3.3. Cytosinarabinosid
 - 3.3.1. Vorversuche
 - 3.3.1.1. Dosis und Zeitpunkt
 - 3.3.1.2. Verteilung (^3H -ARA-C)
 - 3.3.2. Begleitende Kontrollbestimmungen
 - 3.3.2.1. Serum
 - 3.3.2.2. Fruchtwasser
 - 3.3.2.3. Laugen-Säuren-Fraktionierung
 - 3.3.3. Hauptversuch
 - 3.3.3.1. Nucleotide
 - 3.3.3.2. Basen
 - 3.3.4. Zusammenfassung
- 4. Ausblick
=====
- 5. Anhang: Tabelle (Nucleotide und Basen)
Programme und Muster
Literaturverzeichnis

1. Vorwort

Nach Untersuchungen von NEUBERT und Krowke (1970) ist es möglich, Nucleinsäuren in verschiedenen Stadien der embryonalen Entwicklung mit ^{14}C -Glucose und ^{32}P -Orthophosphat zu markieren.

Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, eine Methode auszuarbeiten, die es gestattet, die Synthese des Basenanteils sowie der Ribosebausteine in den RNA-Bruchstücken im embryonalen Gewebe *in vivo* zu untersuchen. Die Methode sollte dann dazu benutzt werden, die Wirkungsweise von embryotoxischen Substanzen näher zu analysieren. Es wurden vorzugsweise die klar zu definierenden ribosomalen RNA-Komponenten untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß einige Nucleinsäure-Antimetaboliten die Synthese von Nucleotiden und Basen und damit den Grad der radioaktiven Markierung von RNA beeinflussen können.

Die Bewältigung der gestellten Aufgabe setzt die Lösung folgender Probleme voraus:

- 1.) Es steht wenig Material zur Verfügung; denn die Embryonen in der gewünschten Phase der Entwicklung sind außerordentlich klein (15 mg Feuchtgewicht am Tag 12 (KÜHLER et al. 1971)). Darüber hinaus sind die radioaktiven Substanzen kostspielig. Die Bestimmungen mußten also im Mikromaßstab durchgeführt werden.
- 2.) Die spezifische Aktivität ist besonders in den Basen äußerst gering. Die Messung mit einem "low-level- β -counter" erwies sich als zweckmäßig und wurde deshalb für diesen Zweck in unserem Labor eingeführt.
- 3.) Zur Bestimmung des Molverhältnisses der Basen zueinander wurde eine Methode erarbeitet, die für geringste Nucleinsäuremengen

(ca. 15 μ g) ausgelegt ist.

Mit Hilfe der erarbeiteten Methoden ist es möglich, den RNA-Stoffwechsel an Warmblüterembryonen in relativ frühen Entwicklungsstadien zu untersuchen. (BOCHERT et al.) Das ist ein Teilproblem unseres Projektes im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 29 der DFG.

1.1. Einleitung

Embryonales Gewebe von Warmblütern hat eine extrem hohe Proliferationsrate. Bei Rattenembryonen, an denen wir unsere Versuche ausführen, nimmt die Zellzahl in dem Zeitraum von Tag 8,5 bis 13 etwa um den Faktor 2000 zu (KÖHLER et al.). Am Tag 13 wird die Organogenese weitgehend abgeschlossen, und die Ernährung ist zu diesem Zeitpunkt voll von der Diffusion auf eine plazentare Versorgung umgestellt worden.

Wie viele morphologisch-teratologische Untersuchungen gezeigt haben, ist das embryonale Gewebe während der Phase der Organogenese besonders empfindlich gegenüber äußeren, schädigenden Einflüssen. Diese Einflüsse können in den verschiedensten physikalischen Faktoren bestehen (Strahlen, Stress usw.), aber auch in einer Fehlernährung oder in Pharmakoneinwirkungen. Biochemische Untersuchungen in der Phase der Organogenese sind daher besonders interessant und aufschlußreich.

Der Zeitpunkt der Embryonalentwicklung ist für die Planung der Versuche von großer Bedeutung. KROWKE (1970) zeigt die Abhängigkeit des Einbaues von radioaktiv markierter Glucose und Phosphat vom Entwicklungsstadium: Je jünger die Embryonen sind, desto höher ist die Einbaurate in die Ribonucleinsäure.

Auf der einen Seite ist der für die Untersuchungen besonders interessante Zeitraum durch den Abschluß der Organogenese begrenzt. Auf der anderen Seite sind die jüngeren Embryonen kleiner und für die

Isolierung einer bestimmten Menge Nucleinsäure sind mehr Muttertiere erforderlich. Für die hier auszuführenden Untersuchungen kommen nur die Tage 11 und 12 infrage. Nach Möglichkeit werden die Embryonen am Tag 12 untersucht, weil sie etwa sechsmal mehr Substanz enthalten als am Tag 11.

1.2. Schwangerschaftsdatierung

Es ist bisweilen üblich, die Tiere über Nacht zur Paarung zusammenzulassen. Unter diesen Umständen kann die Befruchtung im Extremfall am Anfang oder am Ende der Nachterfolge, also möglicherweise 12 Stunden auseinanderliegen. Man erhält dann Embryonen in den Entwicklungsstadien zwischen Tag 11 und 11,5. Das Feuchtgewicht sowie der DNA- und RNA-Gehalt erhöhen sich in dieser Zeit um das 3 - 4-fache.

Deshalb werden die Ratten nur zwei Stunden lang in einem verschobenen Tag-Nacht-Rhythmus zur Paarung zusammengesetzt. Die Embryonen befinden sich dann alle in annähernd derselben Entwicklungsphase. Die nachfolgende 24-Stunden-Periode wird als "Tag null" bezeichnet.

Nach der Paarung wird ein Vaginal-Abstrich vorgenommen: Werden Samenfäden in der Vagina gefunden, hat eine Befruchtung stattgefunden. Diese Kontrolle ist wichtig, weil sich am Tag 11 oder 12 mit bloßem Augenschein oder Abtasten bei der Ratte die Schwangerschaft nicht erkennen lässt.

1.3 Prinzip der Markierung

Die uniform ^{14}C -markierte Glucose wird in 6-Stellung mit Hilfe von ATP phosphoryliert. Es bildet sich das Glucose-6-Phosphat, das im oxydativen Teil des Pentose-Phosphat-Weges weiter umgesetzt wird. Das C-Atom in 1-Stellung wird abgespalten und als CO_2 ausgeatmet. Anschließend wird das entstandene Ribose-5-Phosphat mit ATP umgesetzt. Es ent-

steht Phosphoribosylpyrophosphat - PRPP - (Abb. 1).

Für die Bildung der Purine wird PRPP mit Glutamin zum Phosphoribosylamin umgesetzt, das dann mit Glycin gekoppelt wird. Damit sind die späteren Atome 9, 4 und 5 des Puringerüsts vorgebildet. Weitere Bausteine werden dann schrittweise angehängt (Abb. 2).

Die Pyrimidine werden aus Asparaginsäure und Carbamylphosphat synthetisiert. Das PRPP wird erst an das fertige Orotat gekoppelt (Abb. 3). Auch hier wird Pyrophosphat vom PRPP abgespalten, während das am C-5 befindliche Phosphat in der α -Stellung des späteren Triphosphates bleibt.

Der weitergehende Abbau der Glucose liefert radioaktiv markierte Bausteine, aus denen unter anderem Purin- und Pyrimidinbasen aufgebaut werden. Dieser Syntheseweg läuft hauptsächlich über ^{14}C -markierte Aminosäuren. Bei der direkten Entstehung der Ribose aus der uniform markierten Glucose ist auch die Ribose uniform markiert und besitzt darum eine hohe spezifische Aktivität (spez. Akt.). Bei den Basen kann nur eine geringere spez. Akt. erwartet werden als bei der Ribose, da nicht alle C-Atome aus der markierten Glucose stammen, bzw. erst auf "Umwegen" in den "precursor pool" gelangen.

Bei der schon erwähnten Bildung des PRPP kann an Stelle des inaktiven Phosphates ^{32}P -markiertes Phosphat - über ATP - eingebaut werden. Über PRPP gelangt radioaktiv markiertes Phosphat in die α -Stellung bei den Nucleotiden (Abb. 1).

Die Nucleinsäuren entstehen nicht nur auf dem Wege der "de-novo-Synthese" sondern auch durch den Wiederaufbau mit schon "gebrauchten" Bausteinen ("salvage-pathway"). Wenn es sich hierbei um Basen handelt, können diese mit PRPP wieder zu Nucleotiden aufgebaut werden. Nucleoside können durch die direkte Phosphorylierung mit ATP in Nucleotide umgewandelt werden (Abb. 1).

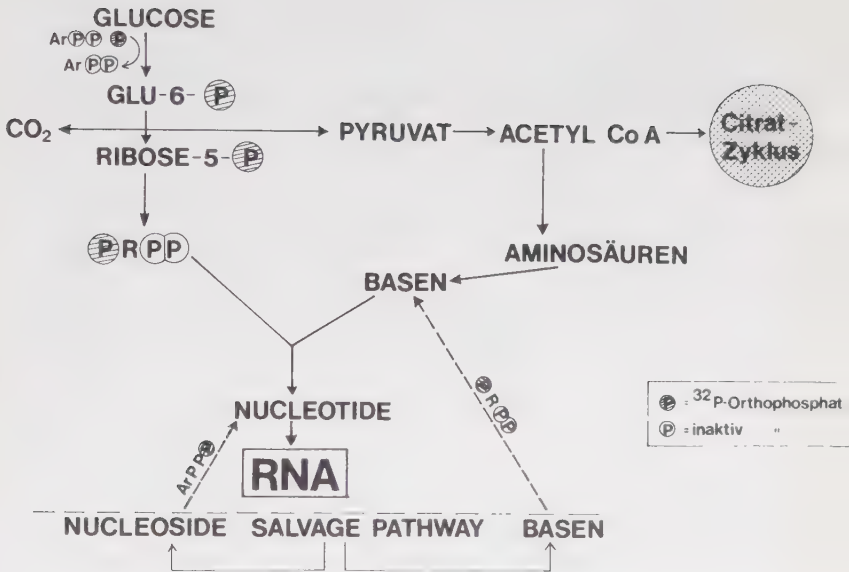


Abbildung 1:

Schematische Übersicht über den Einbau von ^{14}C -u-Glucose in Nucleinsäurebausteine (de-novo-Synthese und salvage-pathway). Es ist ersichtlich, daß mit Glucose sowohl der Riboseanteil als auch die Basen markiert werden können. Mit ^{32}P -Orthophosphat können die Nucleotide in α -Stellung markiert werden.

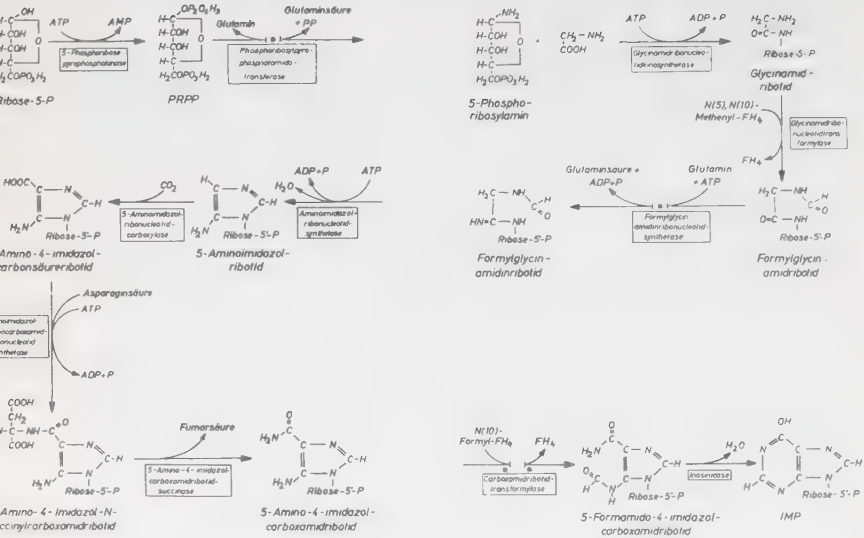


Abbildung 2:
Zusammenfassende Übersicht der Purinbiosynthese bis zur
Bildung von Inosinmonophosphat (aus DOMAGK, G.F.; In:
Die Nucleinsäuren, von Harbers, E., G.F. DOMAGK, W. Mül-
ler. Thieme, Stuttgart 1964).

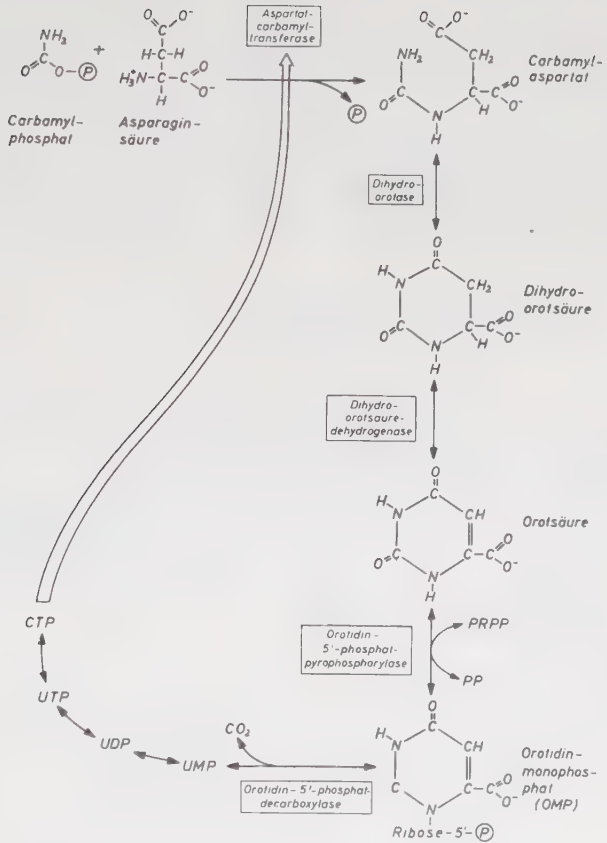


Abbildung 3:
Übersicht über die Pyrimidinbiosynthese. Der offene Pfeil
deutet die Rückkopplungshemmung der Aspartat-carbamyl-
transferase durch UTP (bei Säugetieren) an. (Aus: Nuclein-
säuren, von E. Harbers, Thieme, Stuttgart 1969).

Unter definierten Versuchsbedingungen wird sich ein bestimmtes Verhältnis zwischen ^{14}C und ^{32}P -Einbau in den Nucleinsäuren einstellen. Wird durch die Einwirkung eines Pharmakons das Stoffwechselgleichgewicht derart gestört, daß sich die Anteile der de-novo-Synthese und des salvage-pathways an der gesamten Nucleinsäurenproduktion verändern, (z.B. durch Blockierung eines für die de-novo-Synthese zuständigen Enzyms), dann hat das auch einen Wechsel in dem Verhältnis von ^{14}C zu ^{32}P -Einbau zur Folge. Mit Hilfe dieser Doppelmarkierungsmethode lassen sich also auch Aussagen über den salvage-pathway machen.

1.4. Übersicht durch Laugen-Säuren-Fraktionierung

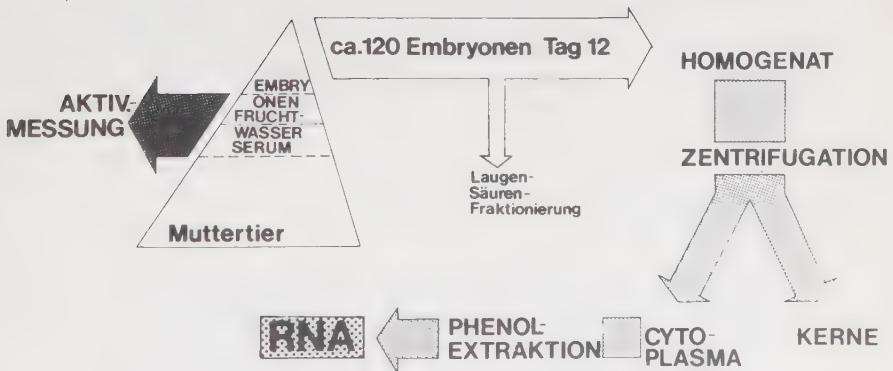
Von der Erkenntnis ausgehend, daß sich eine Vielzahl von Stoffwechselprodukten mit ^{14}C -Glucose und ^{32}P -Phosphat markieren lassen, wurde in unserem Institut eine Methode entwickelt, die nicht nur die Markierung in DNA und RNA erkennen läßt, sondern auch in den sogenannten Protein-, Glycosaminoglycan-, Lipid- und säurelöslichen Fraktionen (KROWKE 1971 b)). Es zeigt sich unter dem Einfluß von Pharmaka, daß die spez. Aktivitäten der einzelnen Fraktionen charakteristisch gehemmt oder gesteigert werden können (KROWKE 1971 a)).

Es ist sinnvoll, zunächst einen Versuch mit der Laugen-Säuren-Fraktionierung durchzuführen, bevor man an eine Untersuchung der Nucleinsäurebausteine herangeht, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wird. Durch die Laugen-Säuren-Fraktionierung gewinnen wir mit einem geringeren Aufwand an Arbeit und Material erst einmal die Information, ob eine weitergehende Untersuchung des Nucleinsäurestoffwechsels überhaupt sinnvoll ist. Diese Frage wird auf alle Fälle bejaht, wenn eine signifikante Hemmung festgestellt wird. Eine Erhöhung der spez. Akt. kann aber auch interessant bei der Embryonalentwicklung und ein Ausdruck einer Schädigung sein.

Allerdings werden zwei wichtige Fragen durch die Laugen-Säuren-Fraktionierung nicht beantwortet:

1. Wie verhält sich die spez. Akt. in den einzelnen RNA-Species ?
2. Wie verhält sich die spez. Akt. in den Bausteinen der einzelnen Species ?

Während die erste Frage durch Anwendung der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation, der Molekularsiebfraktionierung oder der Gel-Elektrophorese beantwortet werden kann, zeigt die vorliegende Arbeit einen Weg zur Lösung des zweiten Problems.



Schematische Darstellung der Aufarbeitung der Rattenembryonen bis zur Isolierung der RNA.

2. METHODIK

=====

2.1. RNA-Gewinnung

Aus dem Zytoplasma von Rattenembryonen wird mit der Phenolextraktion (KIRBY) in Verbindung mit RNAase-Inhibitoren wie Polyvinylsulfat (PVS) (BERNFELD) und Laurylsulfat (SDS) (HALL und DOTTY), das gleichzeitig als Detergenz fungiert, ribosomale und transfer RNA isoliert. Die RNA-Spezies werden mittels Saccharose-Gradienten-Zentrifugation von einander getrennt und einzeln, jede für sich, zu Nucleotiden und Basen hydrolysiert, deren spezifische Aktivität bestimmt wird.

Die für die RNA-Präparation erforderlichen Zentrifugengläser und andere Geräte werden zur Eliminierung der RNAase in verdünnter HCl oder HClO_4 erhitzt. Nach dem Spülen und Trocknen werden die Zentrifugengläser silikonisiert, um Verluste an RNA durch Adsorption zu vermindern.

2.1.1. Homogenat

Die Embryonen werden sofort nach dem Herauspräparieren in einem Potter-Evelhjem-Homogenisator zerkleinert. Die dazu verwendete Lösung besteht aus 0,32 M Saccharose, 3mM MgCl_2 und 10 mM Natrium-Azetat-Puffer pH 5,2 (NEUBERT et al.). NEUBERT gibt in seiner Arbeit einen pH 7,4 an. Hier wird die Saccharoselösung auf den pH 5,2 eingestellt, weil die RNAase bei diesem pH gehemmt ist. In einem ml dieser Mg-Saccharoselösung werden entweder ein Embryo Tag 13 oder 4 Embryonen Tag 12 oder 24 Embryonen Tag 11 homogenisiert.

2.1.2. Homogenat-Fraktionierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur zytoplasmatische RNA-Spezies untersucht. Die DNA, die die Aufarbeitung der RNA behindert, ist im wesentlichen im Zellkern lokalisiert. Darum ist eine Abtrennung der Zellkerne vom Zytoplasma sinnvoll. In der Zentrifuge Mistral 4 L sind die Kerne nach 10 Min. bei 1.500 rpm sedimentiert.

2.1.3. Phenol-Extraktion

Zu 9 ml des Überstandes werden 1 ml SDS/PVS-Lösung gegeben (5 % SDS, 0,05 % PVS, 30 mM MgCl₂, 0,5 M Natrium-Azetat-Puffer, pH 5,2). Die zuvor opake Lösung wird klar durchsichtig. Es wird das gleiche Volumen Phenolkresol-Lösung (500 g Phenol, 70 g m-Kresol, 0,8 g Oxin und Wasser bis zur Sättigung) zugegeben und 20 Min. lang bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt. Die Emulsion wird in einer Christ-KS-Zentrifuge in 15 Min. bei 5.000 rpm aufgetrennt. Die Phenolphase wird mit 1/4 ihres Volumens an Wasser und 1/10 dieses Volumens an SDS/PVS-Lösung nachextrahiert. Die vereinigten wässrigen Lösungen werden mehrfach ausgeäthert, um auch das restliche Phenol vollständig zu extrahieren.

Zu dieser Lösung werden 2 - 3 % Kalium-Azetat und das 2,1/2-fache Volumen an absolutem Alkohol gegeben. Bei -20°C fällt die RNA über Nacht aus. Nach 20 Min. bei 5.000 rpm in der Christ-Zentrifuge ist die RNA sedimentiert. Die RNA wird einmal mit Alkohol nachgewaschen und dann im Vacuum (10 - 20 Torr) getrocknet.

2.1.4. DNAase-Behandlung

In der Präparation befindet sich etwas DNA, die hauptsächlich aus Kernbruchstücken stammt, die bei der Homogenisation entstanden sind. Die DNA überlagert sich auf dem Saccharose-Gradienten mit der 28s

und 18s RNA und muß deshalb vorher beseitigt werden. CLICK und HACKETT sind der Ansicht, daß die DNA-Überlagerung hauptsächlich auf den 18s-peak beschränkt ist.

Die RNA wird in einer Lösung aufgenommen, die 3 bis 4 mM $MgCl_2$ und 10 mM Tris-Puffer, pH 7,4 bis 7,5, enthält. Pro 12 Tage Embryo werden 5 μg DNAase (RNAase-frei von SCHWARZ BIORESEARCH oder WORTHINGTON) zugegeben. Bei Raumtemperatur wird 20 bis 30 Minuten lang inkubiert. Dann wird die RNA, wie schon beschrieben, wieder ausgefällt.

Durch die DNAase-Behandlung ist die RNA wieder mit Protein verunreinigt worden, das durch eine weitere Phenolextraktion entfernt wird. Hierfür wird, wie in 2.1.3 vorgegangen, allerdings nur mit einem Viertel Volumen Phenol-Lösung.

2.1.5. Reinheit der RNA

Zur Demonstration der Reinheit der RNA wurde diese über eine Sephadex-G-25-Säule gegeben. Die Kurve in der Abbildung 4 zeigt, daß neben den hochmolekularen Ribonucleinsäuren praktisch keine kleinemolekularen Verunreinigungen, wie Basen, Nucleotide etc. anzutreffen sind. Der RNA-peak läßt sich von den Verunreinigungen getrennt auffangen, wenn diese in größerem Maße vorhanden sein sollten.

2.1.6. Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Nachdem die RNA rein gewonnen wurde, kann sie in ihre Komponenten aufgetrennt werden. Das geschieht durch eine Saccharose-Gradienten-Zentrifugation.

Die RNA wird in einem 50 mM Natrium-Azetat-Puffer, pH 5,2, aufgenommen und 0,2 ml dieser Lösung werden auf einen Gradienten aufgetragen. Der Gradient mit einem Gesamtvolumen von 5 ml besteht aus einem am

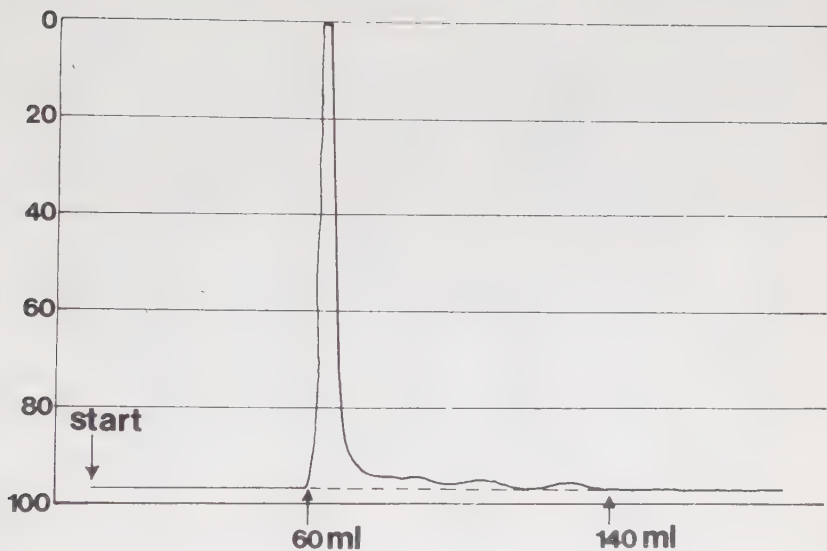


Abbildung 4:

Die Abbildung zeigt das Profil (260 nm; Transmissionsmessung) einer RNA-Gelfiltration über Sephadex-G-25-fine (Säule: 32 x 2,5 cm). Elutionsmittel: 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 - 7,5. Die nach dem in "Methodik" beschriebenen Verfahren gewonnene RNA ist von kleinemolekularen Bruchstücken weitgehend befreit.

Boden befindlichen "Kissen" (0,3 ml 50 %ige Saccharose-Lösung), worauf sich der lineare Gradient von 20 % - 5 % Saccharose aufbaut. In einer Zentrifuge (Spinco L 2 65 B) läuft der Gradient in einem Rotor (SW 65) bei 65.000 rpm 170 Min. lang. Wird ein SW 25-Rotor verwendet, dessen Gradienten eine größere Kapazität haben, läuft die Zentrifuge 16 Std. lang mit 2.500 rpm.

Die Gradienten werden am Boden angezapft und in Fraktionen à 10 Tropfen zerlegt. Es werden jeweils 0,5 ml Wasser zugegeben und von dieser verdünnten Lösung wird die optische Dichte bei 260 nm bestimmt. In einem Koordinatensystem wird die Extinktion gegen die Fraktionsnummer aufgetragen und man erhält einen typischen Kurvenverlauf (Abb. 6).

Man kann aus einem Aliquot der einzelnen Fraktionen die Radioaktivität bestimmen. Die erhaltenen Werte werden in dpm/ml umgerechnet und in ein Koordinatenkreuz eingetragen. Man erhält so eine erste quantitative Aussage über die spez. Akt. der einzelnen Spezies der ribosomalen Ribonucleinsäuren. Da aber im Hinblick auf das Ziel dieser Methodik die gewonnene Aussage gering und der Aufwand nicht unerheblich ist, wird hier auf die Auswertung der Radioaktivität der Gradienten verzichtet, um Substanz zu sparen.

Die Fraktionen der einzelnen peaks werden deshalb gesammelt und dann wird aus diesem batch die spez. Akt. bestimmt. Aus den zusammengefaßten Fraktionen wird die RNA, wie in 2.1.3. beschrieben, ausgefällt. Der Niederschlag wird mehrfach mit 70 %igem Alkohol gewaschen, bis er von Saccharose befreit ist. Die gewaschene RNA wird im Vacuum getrocknet (10 - 20 Torr) und in ca. 1 ml konzentrierter Ameisensäure gelöst.

Es ist nicht ganz auszuschließen, daß die Ameisensäure zur Bildung von Apurinsäuren führt. Das stört aber die nachfolgende Nucleotidbestimmung nicht, weil eventuell entstandene Apurinsäuren bei der Elektrophorese von den Nucleotiden abgetrennt werden. Die charakteristischen Wellenlängenverhältnisse, die für die eluierten Nucleotide gemessen

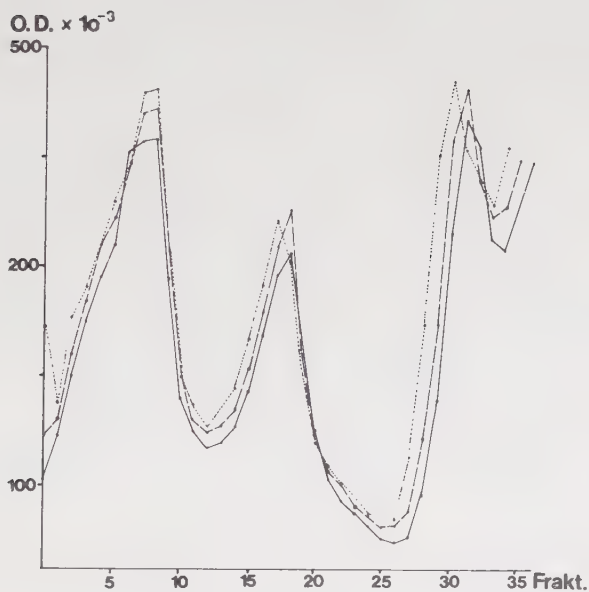


Abbildung 6:

Cytoplasmatische, aus Rattenleber isolierte RNA (ribosomale und transfer RNA) wurde auf 3 Testgradienten (siehe Abb. 5) nach ihrem Sedimentationsverhalten in 28s und 18s (ribosomale Komponente) und 4s (transfer RNA) peaks aufgetrennt. Maxima und Minima der Kurvenverläufe differieren um höchstens ± 1 Fraktion. Die Extinktion wurde bei 254 nm gemessen.

wurden, entsprechen weitgehend den Werten der Literatur (siehe Anhang), was für ihre Reinheit spricht.

Die freien Apurinsäuren verhalten sich bei den Bedingungen der Elektrophorese (pH 3,6) kationisch im Gegensatz zu den anionischen Nucleotiden. Sie laufen also in die entgegengesetzte Richtung. Es konnten keine Apurinsäuren beobachtet werden, was dafür spricht, daß sich keine gebildet hatten oder daß sie in ganz geringer Konzentration vorhanden sind.

In einer Hinsicht würde sich die Entstehung der Apurinsäuren nachteilig auswirken: Wenn man aus den Nucleotiden das molare Verhältnis der Nucleinsäurebausteine zueinander ermitteln wollte. Davon wird hier schon aus einem anderen Grunde Abstand genommen. Das Nucleotidhydrolysat wird mit einem Ionenaustauscherharz entsalzt. Bei diesem Harz ist mit einem unterschiedlichen Retentionsverhalten gegenüber den einzelnen Nucleotiden zu rechnen und dementsprechend mit einer Veränderung der molaren Verhältnisse. Das beste Verfahren zur Bestimmung des Molverhältnisses ist, wie noch beschrieben wird, die direkte Auswertung des ameisensauren Hydrolysates auf einer DC-Platte.

2.1.7. Reproduzierbarkeit der Gradienten

Die Reproduzierbarkeit der Gradienten wird durch zwei Experimente demonstriert. Abb. 5 zeigt drei Gradienten, bei denen der Brechungsindex der einzelnen Fraktionen mit dem Refraktometer gemessen wurde. Die drei Kurven verlaufen recht parallel und dicht beieinander. In den Fraktionen 1 - 6 befindet sich das 50 %ige "Saccharose-Kissen". Dieses Kissen wird direkt von maximal 20 %iger Saccharose-Lösung überlagert, und es findet eine Vermischung der beiden Konzentrationen durch Diffusion statt. Deshalb nimmt der Brechungsindex in den Fraktionen von Nr. 1 bis Nr. 6 rapide ab.

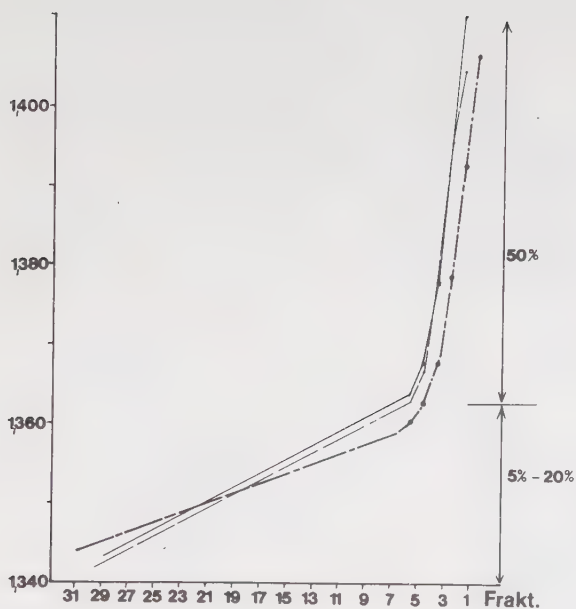


Abbildung 5:
Der Brechungsindex dreier Saccharosegradienten (5 % - 20 %, 0,3 ml 50 %iges "Kissen") ist nach Zerlegung in 31 Fraktionen bestimmt worden. Für den Bereich der Fraktionen zwischen 7 und 31 verlaufen die Kurven linear und dicht beieinander. Die Gradienten sind sehr gut reproduzierbar.

Der eigentlich lineare Verlauf des Gradienten, der für die Auftrennung der RNA-Spezies wesentlich ist, erstreckt sich auf die Fraktionen etwa von der Nr. 7 an aufwärts. Für diesen Bereich zeigt die Abb. 5 einen geraden Kurvenverlauf.

Ribosomale RNA aus Rattenleber wurde gleichzeitig über drei verschiedene Gradienten getrennt. Die Gradienten wurden in 35 - 37 Fraktionen zerlegt und deren Extinktion bei 260 nm bestimmt. Abb. 6 zeigt die Kurven der drei Gradienten, die sich ergeben, wenn die Extinktion der einzelnen Fraktionen gegen die Fraktionsnummer aufgetragen wird. Die drei Kurven decken sich sehr gut, und für die Maxima gilt eine Abweichung von ± 1 Fraktion.

Beide Beispiele zeigen die gute Reproduzierbarkeit der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation.

2.2. Nucleotide

Etwa ein Drittel der RNA-Ameisensäure-Lösung wird für die Nucleotidbestimmung eingesetzt. Die Ameisensäure wird im Vacuum (10 - 20 Torr) abgedampft.

2.2.1. Hydrolyse

Der Rückstand wird mit 0,5 - 1,0 ml 0,3 N KOH versetzt und 16 - 18 Std. lang bei 37° C hydrolysiert. Dieses Verfahren wird von MARRIAN et al. als besonders schonend angegeben. Desaminierung von Cytosinmonophosphat wird weitgehend vermieden.

BOCK gibt eine Übersicht über Variationen der alkalischen Hydrolyse für RNA. Er empfiehlt u.a. eine Modifikation mit 0,1 N KOH bei 100° C während 20 Min.. Abb. 7 zeigt ein Versuchsergebnis, das nach diesen Angaben durchgeführt wurde: Eine Desaminierung ist nicht zu verhindern.

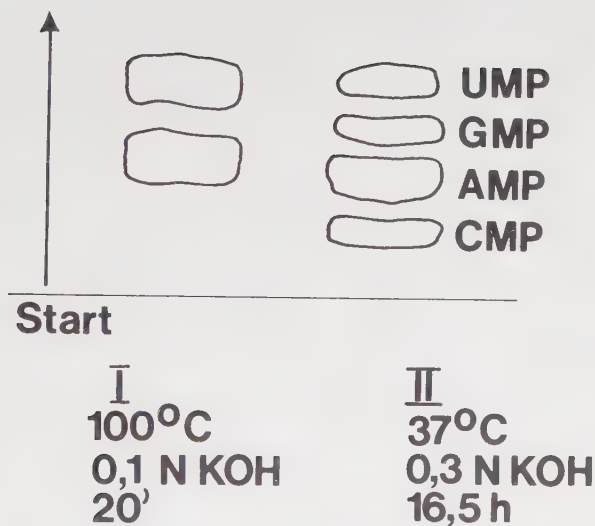


Abbildung 7:
Vergleich zwischen zwei alkalischen Hydrolysemethoden.
Das demineralisierte Hydrolysat wurde elektrophoretisch
getrennt (siehe Methodik). Unter den Bedingungen der
Hydrolyse I werden GMP und ganz besonders CMP degradiert.

Die lange Hydrolysedauer nach MARRIAN ist zwar umständlich, aber sicher bei den entsprechenden Bedingungen .

2.2.2. Entsalzung

Die Entsalzung des Hydrolysates kann mit Perchlorsäure erfolgen, denn Kaliumionen bilden mit dem Anion der Perchlorsäure ein unlösliches Salz, das sich z.B. abzentrifugieren läßt. Diese häufig angewandte Methode hat zwei Mängel: Zum einen ist das Löslichkeitsprodukt des Kaliumperchlorates nicht gering genug, um eine 100 %ige Entsalzung zu gewährleisten, und vor allem bei geringen Volumina ist eine exakte Neutralisation kaum möglich. Zum anderen reißt das Perchlorat beim Ausfällen auch Nucleotide mit, die dadurch verlorengehen. Bei geringen Nucleotidmengen vermeidet man besser diese Methode.

Gute Ergebnisse zeitigt die Anwendung des Kationenaustauscherharzes Dowex 50 WX 4 (oder WX 8). Die Nucleotide liegen als Anionen vor und werden von dem Harz kaum zurückgehalten, während die Kaliumionen vollständig gebunden werden.

Die Säule, in der die Entsalzung stattfindet, hat einen Durchmesser von 6 mm. Das Harz wird bis zu einer Höhe von 10 mm aufgefüllt. Es wird mit 0,1 N HCl equilibriert und mit reinem Wasser nachgewaschen, bis sich keine Wasserstoffionen und keine Extinktion bei 260 nm mehr nachweisen lassen. Nachdem das Hydrolysat auf die Säule gegeben worden ist, werden die Nucleotide mit ca. 8 ml Wasser eluiert. Das Eluat wird in einer Lyophilisationsanlage von LEYBOLD-HERAEUS getrocknet.

2.2.3. Elektrophorese

Nach CLICK kann die elektrophoretische Auftrennung der Nucleotide ohne Entsalzung durchgeführt werden, wenn man mit höherer Puffermolarität und geringerer Stromstärke arbeitet. Unter solchen Bedingungen kann aber nicht der Vorzug einer Hochspannungselektrophorese (HVE) zum Zuge kommen. Der Vorteil der HVE liegt in einer schnelleren und besseren

Trennung . Zu hohe Puffermolarität führt leicht zu Schwanzbildung durch lokale Feldstärkenänderung.

Zur Ausführung der Hochspannungselektrophorese nach DAVIDSON, SMELLIE und SMITH wird der Gefriertrocknungsrückstand in möglichst wenig Wasser gelöst und mit einer Kapillare strichförmig auf das Elektrophoresepapier von SCHLEICHER & SCHÜLL (2043 bMgl) aufgetragen. Es wird Citratpuffer 50 mM pH 3,6 verwendet. Die Elektrophorese dauert bei 5000 V ca. 15. Min.. Hierbei ist wesentlich, daß die Elektrophoresekammer auf $+ 1 - 2^{\circ}\text{C}$ gekühlt wird.

2.2.4. Elution

Die einzelnen Nucleotide und die dazu gehörenden Leerwerte werden ausgeschnitten, in kleine Stücke geschnitten und in Eppendorf-Reagenzgefäßen zweimal mit je 0,2 ml 0,1N HCl eluiert. Nach jeweils 20 minütigem Schütteln wird 2 Min. zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Die Nucleotid- und Leerwerteluate (HARRIS et al.) werden jeweils für sich gegen 0,1 N HCl im Spektralphotometer gemessen. Auf diese Weise erkennt man Leerwerte, die aus der Reihe fallen.

2.2.5. Aktivitätsmessung

0,3 ml Eluat werden im liquid scintillation counter (PACKARD TRICARB 3380) gezählt. Das Zählergebnis muß korrigiert werden. Nicht nur quenching und Zählheusbeute sind zu berücksichtigen, sondern bei der vorliegenden Doppelmarkierung wird ein Teil des ^{32}P im ^{14}C -Kanal mitgemessen. Bei den gewählten Verhältnissen wird ^{14}C im ^{32}P -Kanal praktisch nicht mitgemessen. Der Anteil ^{32}P im ^{14}C -Kanal ist nicht konstant. Er hängt vom quench-Wert ab wie auch die Zählheusbeute.

Deshalb wurden Kurven (Abb. 8) für die Zählheusbeuten ^{14}C und ^{32}P und ^{32}P im ^{14}C -Kanal aufgestellt, aus denen die Werte für die diversen

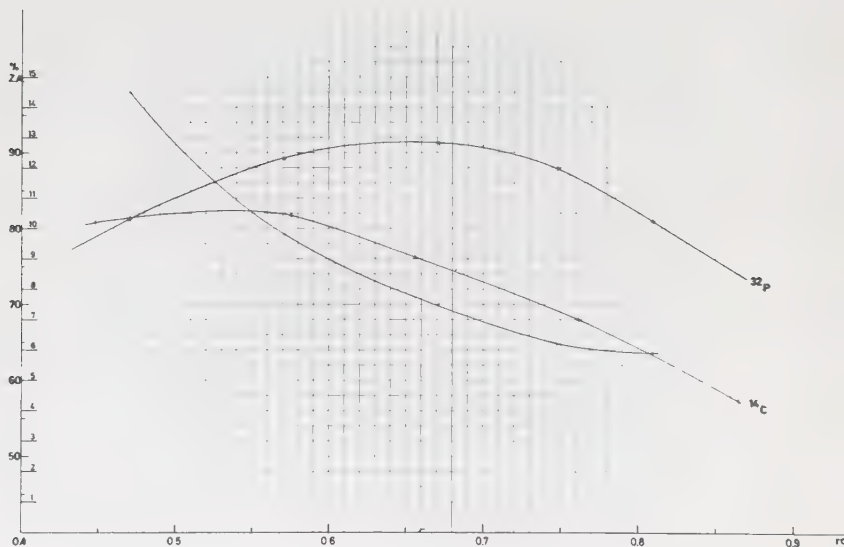


Abbildung 8:

Eichkurven zur Berechnung der Zählausbeuten (ZA) unter den Bedingungen der Doppelmarkierung (^{14}C / ^{32}P). Auf der Abzisse sind die quench-Werte des externen Standards (= ratio) abzulesen. Die linke Zahlenreihe der Ordinate gibt ZA für ^{14}C und ^{32}P in den jeweiligen Kanälen an, während die rechte Zahlenkolonne ZA des höherenergetischen Nuclids in dem Kanal des niederenergetischen (^{14}C) darstellt. Für ^{14}C sind die Diskriminatoren auf 50 - 1000 und die Verstärkung auf 22 % eingestellt. Für ^{32}P ist die Einstellung 120 - 1000 und 1,5 %.

quench-Werte der Proben entnommen werden.

Die Umrechnung der Zählergebnisse auf dpm/definierte Menge besteht aus vielen kleinen Rechenoperationen. Diese wurden in einem Rechenprogramm (für WANG 370) zusammengefaßt. Das Programm befindet sich im Anhang.

Die Zählflüssigkeit setzt sich zusammen aus 8 g PPO und 100 mg POPOP, die zu 2 l Toluol gelöst werden. Dieser Mischung wird 1 l Triton X 100 (Detergens) zugesetzt. Pro Zählgefäß werden 10 ml dieser Lösung eingesetzt und 0,1 - 0,5 ml Probelösung zugefügt. Meistenteils ergibt sich hierbei eine trübe Lösung, die erst durch Zugabe von 0,1 - 0,2 ml 20 %iger Perchlorsäure wieder klar wird.

2.3. Basen

2.3.1. Hydrolyse

Die verbliebenen 2/3 RNA-Lösung werden in einem Bombenrohr 120 Min. lang bei 175^o C hydrolysiert (VISCHER und CHARGAFF). Diese Prozedur gewährleistet die Erhaltung des natürlichen Mol-Verhältnisses der Basen.

Das Bombenrohr steht unter großem Druck und explodiert deshalb leicht bei unsachgemäßer Behandlung. Nach der Hydrolyse läßt man das Rohr erst an der Luft, dann im Tiefkühlschrank abkühlen. Nachdem es in flüssigen Stickstoff getaucht wurde, bis der Inhalt gefroren ist, wird die Spitze der Kapillare (die eine Seite des Bombenrohres wurde zu einer Kapillare ausgezogen, deren Ende zugeschmolzen wurde) im Saum einer scharfen Bunsenbrennerflamme erschmolzen (Schutzbrille).

2.3.2. DC-Trennung

Das Hydrolysat enthält neben den Basen Phosphat und Ribose oder deren Bruchstücke. Sowohl Phosphat als auch der Zucker sind bei dieser Methode radioaktiv markiert und können die Messung der Radioaktivität der Basen stören. Die Ribose bzw. ihre Abbauprodukte absorbieren außerdem UV-Licht. Es ist also nicht nur wesentlich, die Basen voneinander zu trennen, sondern auch die Beiprodukte der Hydrolyse von den Basen zu sondern. Bei der Elektrophorese wird zumindest das Uracil nicht rein erhalten (Abb. 9). Die Trennung der Basen erfolgt daher vorteilhafter dünnsschichtchromatografisch.

Nach KECK und HAGEN erhält man auf Celluloseplatten mit dem Laufmittel Methanol, konz. Salzsäure, Wasser (65:17:18; v:v:v) eine saubere Trennung (Abb. 19). Darüber hinaus verfügt die Methode über zwei Vorzüge:

1. Das gesamte Phosphat (also auch das ^{32}P -markierte Phosphat, das die Messung der ^{14}C -Aktivität stören könnte) befindet sich in der Laufmittelfront (Abb. 10).
2. Die teilweise radioaktiv markierte Ribose und ihre Fragmente sind ebenfalls in der Laufmittelfront wiederzufinden (Abb. 11).

2.3.3. Elution

Für die Bestimmung der spez. Akt. wird bei den Basen prinzipiell genauso vorgegangen wie bei den Nucleotiden. Allerdings wird hier die Substanz nicht von Papier sondern aus einer abgekratzten Celluloseschicht eluiert, und die Radioaktivität wird nach einer anderen Methode gemessen.

Die einzelnen Basenflecke und entsprechenden Leerstellen werden ausgekratzt und wie bei den Nucleotiden beschrieben eluiert. Die Extink-

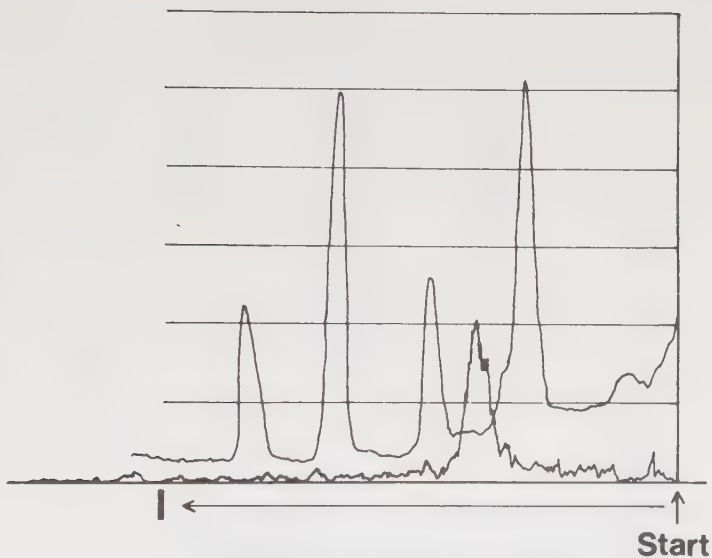


Abbildung 9:

Vergleich zwischen der Verteilung der Basen (ab Start: Uracil, Guanin, Adenin und Cytosin) und dem ^{14}C markierten Ribosehydrolysat (untere Kurve) nach der elektrophoretischen Trennung auf einer DC-Cellulose-Platte. Die Basenkurve wurde mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer (260 nm) und die Radioaktivität mit dem Bertholt Chromatogramm-Scanner aufgenommen. Die Ribose-Hydrolysenprodukte lassen sich von den Basen mit der Elektrophorese nicht abtrennen.

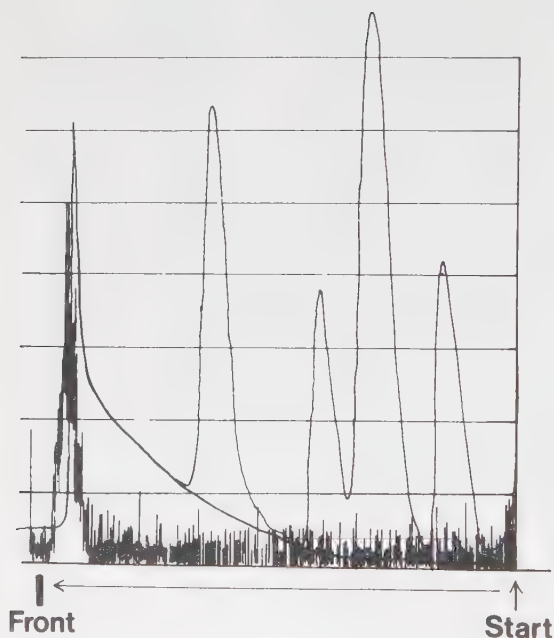


Abbildung 10:

Trennung der Basen (ab Start: Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil) auf der Cellulose-DC-Platte. Zum Vergleich wurde ^{32}P -Orthophosphat mitchromatografiert. Laufmittel nach KECK und HAGEN (siehe Methodik). Auswertung des Chromatogrammes s. Legende d. Abb. 9. Die breit gestrichelte Kurve zeigt den Verlauf der Radioaktivität. In der Front befindet sich ein peak. Die Schreilberauschläge vor der Front entsprechen dem background. Die ^{32}P -Aktivität befindet sich ausschließlich in der Front.

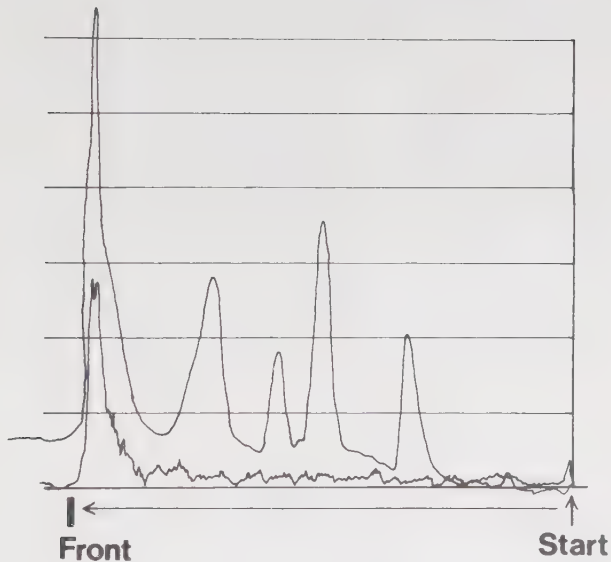


Abbildung 11:

Vergleich zwischen der Verteilung der Basen (ab Start: Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil) und dem ^{14}C -markierten Ribosehydrolysat (untere Kurve) nach verteilungschromatographischer Auftrennung (KECK und HAGEN, s. Methodik). Auswertung des Chromatogrammes s. Legende d. Abb. 9. Die Basen sind durch das Ribosehydrolysat nicht kontaminiert worden.

tion wird im Spektralphotometer (ZEISS PMQ 4) bei der jeweiligen Wellenlänge maximaler Extinktion und den Wellenlängen, die zur Bestimmung der Verhältnisse 250/260 nm, 280/260 nm und 290/260 nm erforderlich sind, gemessen. Diese Verhältnisse sind für die einzelnen Basen charakteristisch und geben Sicherheit bezüglich der Identität und Reinheit der Base. Die in dieser Arbeit gemessenen Werte weichen etwas von den Angaben der Literatur ab (Tab. im Anhang).

2.3.4. Aktivitätsmessung (low-level- β -counter)

Die spez. Akt. der Basen bewegt sich bei den hier angestellten Versuchen zwischen 0,7 und 4 dpm/nmol.. Die meisten Werte liegen bei 1 - 1,5 dpm/nmol.. Der Wert von 0,7 dpm/nmol kann leicht unterschritten werden. So hat BOCHERT (1971) für Basen, die er aus DNA gewonnen hat, eine geringere spez. Akt. ermittelt. Außerdem ist es nicht auszuschliessen, daß andere Pharmaka als 6-MP und Ara-C in den Basen der RNA stärkere Hemmungen bewirken können und die spez. Akt. noch weiter absinkt.

Bei den Überlegungen für die Aktivitätsmessung muß man sich an der unteren Grenze der spez. Akt. orientieren. Eine "zu große" spez. Akt. kann immer durch Verdünnung auf den richtigen Bereich eingestellt werden. Problematisch ist eine zu geringe Aktivität, von der man allenfalls sagen kann, daß sie überhaupt vorhanden ist, aber nicht ihre Größe messen kann. Wenn Teilergebnisse eines Versuches unterhalb des Messbereiches liegen, kann der gesamte Versuch in seiner Aussagekraft erheblich eingeschränkt werden.

Ein liquid-scintillation-counter (LSC) ist für viele Aufgaben der Aktivitätsmessung das Gerät der Wahl und wird hier auch immer eingesetzt - außer bei den Basen. Ein LSC zählt in einer Probe auch dann radioaktive Zerfälle, wenn keine Radioaktivität in das Proben- gläschen eingefüllt wurde (background). Das rührt von der kosmischen und terrestrischen Strahlung, den überall vorkommenden natürlichen

Isotopen, der Phosphorescens und dem "elektronischen Rauschen" - einer Eigenschaft des Gerätes - her. Bei den verwendeten Geräten (PACKARD TRICARB) beträgt der background bei den Bedingungen der Nucleotidmessung (Legende Abb. 8) etwa 20 cpm. Als Minimum für eine quantitative Auswertung wird das zwei- bis dreifache des Leerwertes an counts verlangt, d.h. das Gerät muß 50 - 60 counts zählen. Bei einer spez. Akt. von 0,5 dpm/nmol und einer Zählzelle des LSC von 90 % entsprechend 60 cpm (= dreifacher Leerwert) 130 nmol. Im günstigsten Falle stehen aber für Guanin und Cytosin je 60 nmol und für Adenin und Uracil je 40 nmol zur Verfügung. Die Messung einer so geringen Aktivitätsmenge läßt sich mit einem anderen Gerät durchführen: low-level- β -counter (TRACERLAB, OMNIGUARD).

Der low-level- β -counter verfügt über einen Leerwert von weniger als 1 cpm. Der dreifache Leerwert entspricht ca. 3 cpm und somit bei einer Zählzelle von 39 % 15 nmol einer Base, deren spez. Akt. 0,5 dpm/nmol beträgt.

In der Abb. 12 ist das Prinzip der Zählkammer des OMNIGUARD erläutert. Der background des Gerätes liegt bei 0,6 - 0,8 cpm. Das ist ein grosser Vorzug gegenüber dem TRICARB und wird ermöglicht durch eine dicke Bleipanzierung und das "guard", das die kosmische Strahlung aus dem Zählergebnis eliminiert. Der geringe Leerwert des OMNIGUARD verbessert das Verhältnis Leerwert zu Probe gegenüber dem TRICARB erheblich und bedingt ein besseres Ergebnis, obgleich die Zählzelle weniger als die Hälfte derjenigen des TRICARB ausmacht.

Der OMNIGUARD ist mit einer Gasdurchflußzählkammer ausgerüstet, deren Funktion von der angelegten Spannung abhängt. Um die optimale Spannung zu ermitteln, wird eine "Plateaukurve" angefertigt. Die gemessenen counts einer ^{14}C -Probe werden in ein Koordinatenkreuz gegen die Spannung (in Volt) aufgetragen. Abb. 13 (sample) zeigt die Kurve. Zwischen 975 und 1000 V ist ein starker Anstieg. Dann verläuft sie flach, um bei 1075 V wieder zu steigen. Der Arbeitspunkt - die Spannung, bei der das Gerät arbeitet - soll am Ende des ersten Drittels des Plateaus liegen (1025 V).

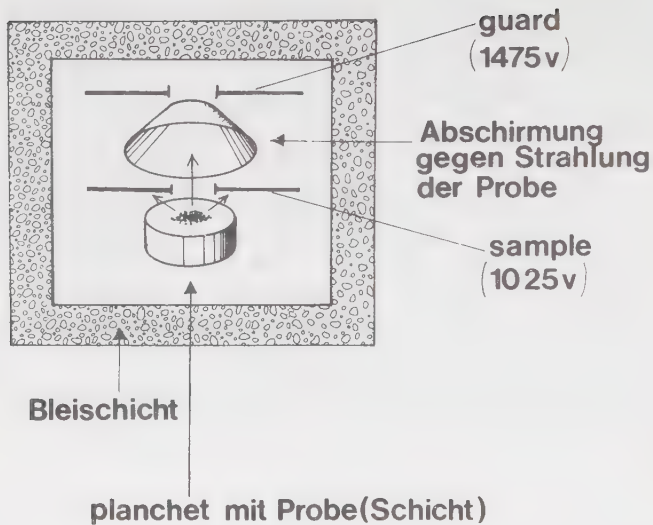


Abbildung 12:
 Schema der Zählkammer des low-level- β -counters
 (Tracerlab, Omniguard).

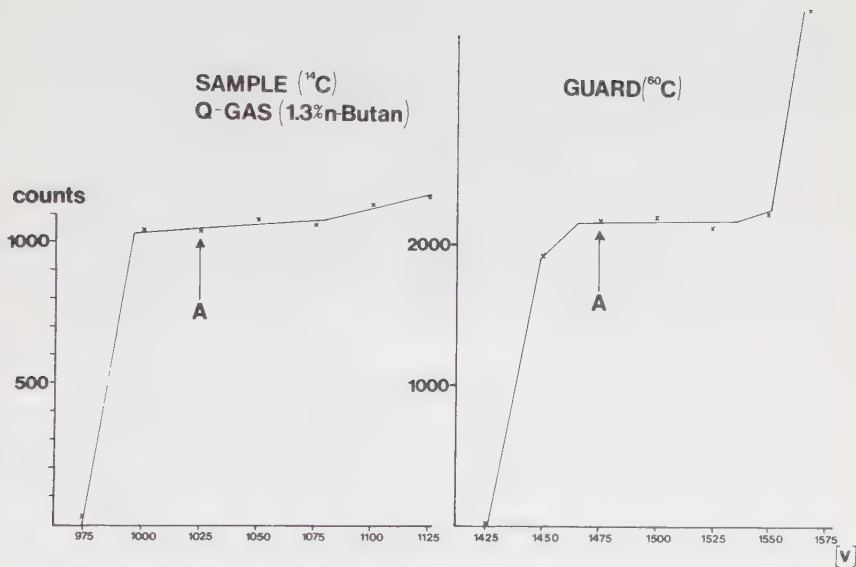


Abbildung 13:
 Plateaukurven für "sample" und "guard" des low-level- β -
 counters. Arbeitsspannung (A) für "sample" 1025 V und
 für "guard" 1475 V bei Verwendung von Q-Gas (98,7 %
 Helium, 1,3 % n-Butan).

Wie in der Abb. 12 zu sehen ist, wird die eigentliche Zählkammer nach oben hin abgedeckt. Über dieser Abdeckung, die den oberen Zählraum gegen Strahlung der Probe abschirmt, befindet sich eine zweite Zählkammer (guard). Auch für sie wird eine Plateaukurve gezeichnet (Abb. 13). Es wird vorgegangen wie bei sample. An der Stelle von ^{14}C wird ^{60}Co benötigt. Der Arbeitspunkt beträgt hier 1475 V.

Die Zählzelle hängt von der Beschaffenheit der Probe ab. Mit 39 % ist sie am größten, wenn die Probe in hauchdünner Schicht auf das Probenschälchen aufgetrocknet worden ist. Mit dicker werdender Schicht sinkt die Zählzelle. Sie misst in einer 0,1 mm dicken DC-Cellulose-Schicht nur noch 18 %.

Für den OMNIGUARD steht kein Computer zur Verfügung, dementsprechend kann der Drucker auch keine Standardabweichungen ausdrucken. Sie wurden aus wiederholter Messung derselben Proben im Bereich von 1000 - 2000 counts mit ± 3 % ermittelt.

Die Berechnung der Proben ist beim OMNIGUARD umständlicher als bei einem liquid-scintillation-counter. Die maximale Zählzelle wird beim OMNIGUARD nur erreicht, wenn sich die zu zählende Probe auf dem planchet in annähernd monomolekularer Schicht ausbreitet.

0,2 bis 0,3 ml der Analysenlösung werden auf die planchets aufgetragen. Auf einer elektrischen Kochplatte wird das Lösungsmittel vorsichtig verdampft. Verwendet man 0,1 N HCl als Lösungsmittel, werden die planchets angegriffen (Bildung von Eisenchlorid). Das Salz bildet am Rande der planchets einen Kranz, der sein Volumen durch Aufnahme von Wasser aus der Luft vergrößert. Dieser Kranz enthält natürlich Radioaktivität, und wenn das planchet vom Aufzug des OMNIGUARD direkt unter das monomolekulare Fenster der Zählkammer gehoben wird, kann der Salzrand das Fenster kontaminieren.

Das läßt sich durch Verwendung von Ameisensäure anstelle von Salzsäure vermeiden. Außerdem bietet das den Vorzug der besseren Löslichkeit der Basen und der höheren Flüchtigkeit der Ameisensäure.

2.4. DC-Auflicht-Spektralphotometer

2.4.1.1. Einleitung

Für die Trennung der 4 Basen Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil werden in der Literatur verschiedene Methoden angegeben:

- a. Ionenaustauscher-Harze
- b. Elektrophorese
- c. Dünnschichtchromatografie

Ende der 40iger Jahre berichtete COHN über die Auftrennung der Basen mittels DOWEX. An den Substanzmengen gemessen, die in der vorliegenden Arbeit analysiert werden, hat er mit sehr großen Mengen und Volumina gearbeitet. Der Versuch einer Miniaturisierung versprach keinen Erfolg, weil vom Harz die radioaktiv markierten Zuckeranteile, die bei der sauren Hydrolyse entstehen, zusammen mit dem Uracil eluiert werden (Tab. 1).

Die Elektrophorese ist zwar noch älter als die Ionenaustauschertrennung, aber ihre wesentliche Weiterentwicklung, die Hochspannungselektrophorese (SMITH und MARKHAM) wurde wenig später eingeführt. Mit diesem Verfahren lassen sich kleine Mengen schnell und sauber trennen, nur gilt hier dieselbe Einschränkung, die für die Harze festgestellt wurde: das Uracil ist verunreinigt (Abb. 9).

Erst die Verteilungschromatografie unter Verwendung von Cellulose-beschichteten Platten mit dem Laufmittel nach KECK und HAGEN (s. Kap. 2.3.) genügt den Anforderungen: alle 4 Basen werden von einander getrennt. Die Verunreinigungen bleiben in der Front (Abb. 10 und 11). Außerdem besticht dieses Verfahren durch seine Einfachheit und Sicherheit.

Zu Beginn der Arbeit verfolgten wir zunächst folgendes Ziel:

Fraktion Nr.	Ribose-Hydrolysat $E_{260}^{1\text{ cm}} \times 10^{-3}$	Uracil $E_{260}^{1\text{ cm}} \times 10^{-3}$
1	0	0
2	90	135
3	65	85
4	30	0

Tabelle 1: Ribose-Hydrolysat (in 90%iger HCOOH , 120 min. 175°C , im Bombenrohr) und Uracillösung wurden getrennt auf eine Ionenaustauscher-Säule (DOWEX 50 WX 8, Säule: 4 cm x 0,6 cm) aufgegeben. Es wurde mit Wasser eluiert und Fraktionen à 1 ml aufgefangen und die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die Uracillösung und das Ribose-Hydrolysat lassen sich nicht trennen.

- a. Trennung der Basen auf der DC-Platte
- b. direkte quantitative Bestimmung der Basen auf der DC-Platte
- c. direkte Messung der Radioaktivität auf der DC-Platte.

Auf diese Art und Weise wäre jegliche Elution entbehrlich geworden, was Arbeit gespart hätte. Weiterhin wäre Substanzverlust vermieden worden und das Basenverhältnis wäre genuin geblieben. Schließlich ergeben 3 Versuchsgruppen zu je 3 RNA-Spezies zu je 4 Basen als 3-fach Bestimmung ausgeführt 108 Proben, zu denen noch 50 - 60 Leerwerte hinzukommen. Jede Probe muß 2 - 3 mal eluiert werden.

2.4.1.2. Elution

Ein anderer Grund läßt die direkte Bestimmung der Basen auf der Platte als besonders wünschenswert erscheinen: die Elution der Substanzen sowohl von der Celluloseschicht einer DC-Platte als auch von Papier ist problematisch, weil neben der zu analysierenden Substanz auch Verunreinigungen aus dem Trägermaterial herausgelöst werden.

Das Eluat der Leerwerte ("blanks") absorbiert UV-Licht (HARRIS et al.). Natürlich ist die Extinktion direkt von der Größe des eluierten Flecken abhängig, aber diese löslichen, UV-Licht-absorbierenden Bestandteile sind nicht gleichmäßig über die Schicht verteilt. Es wurden mehrfach Fälle beobachtet, in denen die Extinktion des Leerwertes das Doppelte der normalen Werte betrug, wobei Irrtümer ausgeschlossen werden konnten.

Alle Bemühungen, die Trennungsmedien vor Gebrauch zu waschen, verliefen unbefriedigend. Wurde Papier so lange gewaschen, bis das Eluat kein UV-Licht mehr absorbierte, war dieser Erfolg nach einer Elektrophorese oder nach einigen Stunden der Lagerung schon wieder zunichte. Offensichtlich werden diese Verunreini-

gungen kontinuierlich aus dem Papier freigesetzt. Nach zu lange anhaltender Waschung (10 Stunden und mehr) verändert das Papier seine Struktur und büßt seine Trennungseigenschaften ein.

Entsprechende Untersuchungen führte HARRIS durch. Bei Kieselgel konnte er zwar Verbesserungen erzielen, indem er 3 Stunden lang im Soxhlet extrahierte, konnte das Übel aber nicht beseitigen.

Bei unseren Versuchen erreichten die Leerwerte Extinktionen zwischen 0,04 und 0,07 bei 260 nm und 1 cm Küvettdicke. Das Ausmaß in dem sich diese Schwankungen des Leerwertes auf die Probe auswirken, hängt von der Konzentration der Probe ab. Die Leerwerte streuen mindestens um $\pm 10\%$. Als Faustregel sollte die Probe wenigstens die 10-fache Extinktion des Leerwertes aufweisen. Dann liegt die Beeinflussung des Probenwertes durch den Fehler des Leerwertes etwa bei $\pm 1\%$.

Die Abbildung 14 zeigt das Spektrum des Leerwertes von Papier im Bereich von 190 - 300 nm. Die Maxima der Basen liegen im rechten Teil der Kurve, wo die Absorption durch den Leerwert schon stark abgesunken ist. Es überschneiden sich dann 2 Extinktionskurven, deren Maxima getrennt liegen. Für einen derartigen Fall berichtet EAST über ein Verfahren zur spektrophotometrischen Bestimmung der Konzentration zweier Stoffe nebeneinander aus einer Lösung, deren Spektren sich zwar überschneiden, aber nicht decken. Diese Methode, die ansonsten exakt ist, muß hier versagen, weil das Spektrum verschiedener Leerwerte schwankt. Offensichtlich ist die chemische Zusammensetzung der UV-Licht-absorbierenden Verunreinigungen uneinheitlich.

Eine weitere Möglichkeit, deren mathematischer Aufwand zu groß ist, wurde hier nicht untersucht: man kann einem Computer oder einer programmierbaren Rechenmaschine die Absorptionskurven der Basen eingeben. Die Verhältnisse der Extinktionen bei verschiedenen Wellenlängen ergeben konstante Werte. Vergleicht die Rechenmaschine die Sollwerte mit den gemessenen, die von der

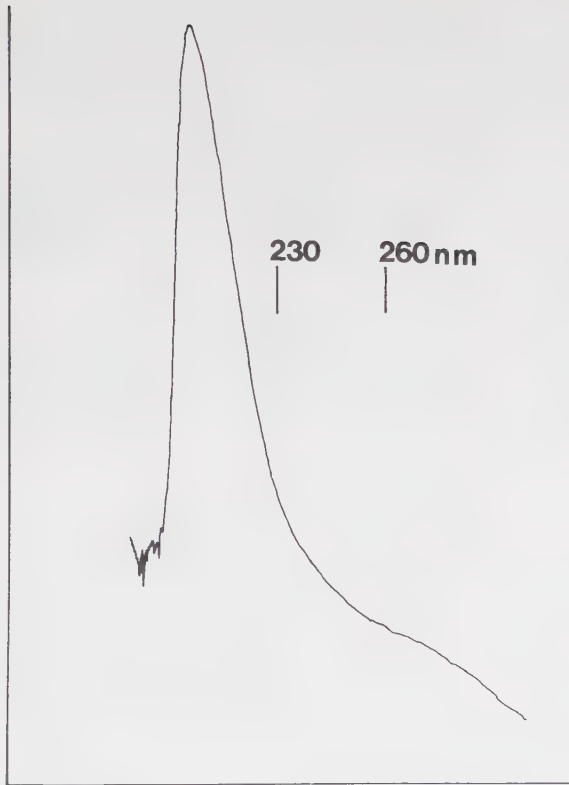


Abbildung 14:
Absorptionsspektrum des Eluates von Elektrophoresepapier (Schleicher+SCHUELL 2043 b MgI) mit 0,1 N HCl. Obwohl das Maximum des Spektrums in einem kürzeren Wellenlängenbereich liegt, als die Maxima der Basen und Nucleotide (245 nm - 280 nm), ist die Schulter im Bereich zwischen 245 nm - 280 nm wegen der geringen Mengen an Basen und Nucleotiden störend.

Leerwertkurve überlagert sind, so kann sie die eigentliche Konzentration der Base errechnen.

Zusammenfassung:

Die Elution von Substanzen und Trägerschichten und die Korrektur durch den Leerwert ist nicht elegant, aber oft nicht zu umgehen. Wenn darauf geachtet wird, daß die Probe mindestens die 10-fache Extinktion des Leerwertes hat, ist der Fehler des Leerwertes für das Endergebnis eine zu vernachlässigende Größe.

2.4.2. Gerätebeschreibung

Ideal, weil die Elution vermieden werden kann, scheint das Verfahren der direkten quantitativen Bestimmung der Basen auf der DC-Platte zu sein, das von STAHL und JORK angeregt wurde. ZEISS entwickelte nach Ihren Vorstellungen eine Gerätekombination, die in der Abbildung 15 schematisch gezeichnet wurde.

Licht des sicht- oder unsichtbaren Bereiches tritt durch den Monochromator hindurch. Der Lichtstrahl gewünschter Wellenlänge trifft senkrecht auf die DC-Platte auf. Im Winkel von 45° zum einfallenden Strahl ist eine Photozelle angeordnet, die das diffus reflektierte Licht mißt. Es schließen sich ein Verstärkerteil und ein Transmissions-Extinktionswandler an. Die Messwerte werden von einem Kompensationsschreiber mit Integrator aufgezeichnet. Diese Geräteanordnung kann in einer etwas anderen Einstellung auch zur Fluoreszenzmessung verwandt werden.

Die DC-Platte bewegt sich auf einem Kreutztisch derart unter dem Meßstrahl, daß dieser den Substanzflecken "überfährt". Dabei wird Licht absorbiert oder bei der Fluoreszenzmessung emittiert. Es tritt eine Änderung des diffusen Lichtstromes ein, die von dem Schreiber als "peak" notiert wird. Der Integrator ermöglicht ein schnelles Ablesen des Flächenwertes.

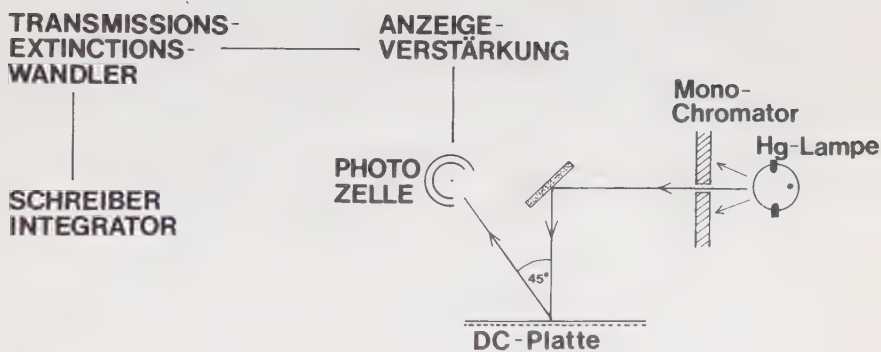


Abbildung 15:
Schematische Darstellung des verwendeten Auflicht-
Chromatogramm-Spektralphotometers (ZEISS).

Die Absorptionskurven sind bei folgenden Bedingungen aufgenommen:
Verstärkerstufe: 10; Transmissions-Extinktionswandler: $E_{\max.} = 0,5$;
Wellenlänge: 260 nm; Spalt: 8 mm lang, 1 - 1,5 mm breit.

2.4.3. Kurvenflächenauswertung

JORK vergleicht Methoden der Flächenauswertung. Die beste Reproduzierbarkeit liefert die direkte Absorptionsmessung. Die Fluoreszenzverfahren sind ungenauer.

2.4.3.1. KUBELKA- MUNK-Funktion

STAHL und JORK gründen die quantitative Auswertung auf die KUBELKA-MUNK-Funktion (KUBELKA). Danach besteht zwischen Konzentration (c) und absoluter Remission (R_{∞}) folgender Zusammenhang:

$$c = k \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2 R_{\infty}}$$

k setzt sich aus mehreren einzelnen Konstanten zusammen, die materialabhängig sind. Somit ist der Remissionsquotient linear abhängig von der Konzentration (JORK).

JORK stellt folgende Forderungen auf:

- a. Geringe spektrale Bandbreite. Denn: das Licht soll möglichst monochromatisch sein. Mit Verringerung der Wellenlänge im UV-Bereich steigt der Teil an regulär reflektiertem Licht. Für UV-Messungen kann hier eine Fehlerquelle entstehen.
- b. Das Mengenverhältnis der aufgetragenen Substanz zum Sorbens soll klein sein. Andernfalls wird die Streueigenschaft des Sorbens verändert und π -Elektronen können sich gegenseitig beeinflussen.

- c. Der Quotient eingestrahelter Wellenlänge durch Schichtdicke soll möglichst klein sein, weil dadurch die Transmission unterdrückt wird.

JORK gibt in seiner Arbeit zwei Beispiele nach seiner Methode. Für die quantitative Bestimmung von Trimethylxanthin ermittelt er einen relativen Fehler von $\pm 3,5\%$ ($n = 23$) und für Acetylsalizylsäure $\pm 3,2\%$ ($n = 17$). Beim Nachrechnen seiner Werte ergibt sich für die Streuung - nicht für den relativen Fehler - der Wiederfindungsquote bei Trimethylxanthin $s = \pm 4,4\%$ und für Acetylsalizylsäure $s = \pm 8,1\%$. diese Werte sollen mit eigenen Ergebnissen verglichen werden. Die Wiederfindungsquote wird hier mit der Streuung um den Mittelwert gleichgesetzt.

2.4.3.2. andere Verfahren

Andere Autoren sind von der KUBELKA-MUNK-Funktion für die quantitative Auswertung abgegangen (EICH, KLAUS 1967). Diese Funktion wird - wie andere Verfahren auch - für diese spezifische Aufgabe als Näherung betrachtet, weil KUBELKA und MUNK eine homogene Verteilung unterstellen, die bei den Substanzflecken nicht gegeben ist. Hier ist die Konzentration im Zentrum am größten und nimmt nach außenhin ab. Deshalb wendet EICH eine andere Abhängigkeit an:

$$(\text{Kurvenfläche})^2 \propto \text{Konzentration}$$

KLAUS (1967) stellt sich eine empirisch ermittelte Eichkurve her, aus der die Werte abgelesen werden. Neben 7 Eichpunkten trägt er auf eine Platte von 20 x 20 cm zwei Analysenpunkte auf.

2.4.4. Reproduzierbarkeit und Auswertung

In dem Buch von SHELLARD "Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography" wird das Problem der Reproduzierbarkeit bei der

quantitativen Bestimmung von mehreren Autoren gründlich untersucht. Auf deren Erfahrungen gestützt wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

2.4.4.1. Punktförmiger Auftrag

Die dünnschichtchromatische Trennung wird durch einen schmalen strichförmigen Auftrag der Analysen-Lösung begünstigt. Deshalb ist ein punktförmiger Auftrag eigentlich nicht vorteilhaft. Andererseits ist die quantitative Auswertung eines Striches schwieriger. Der Strich ist zu lang, um auf einmal von dem Meßstrahl des Chromatogramm-Spektralphotometers erfaßt zu werden. Man müßte gleichsam den Strich über seine ganze Länge Streifen für Streifen abfahren.

Beim punktförmigen Auftragen kann die gesamte Fläche oder jedoch der wichtigste zentrale Teil bei einmaligem Abtasten erfaßt werden. Außerdem benötigt man beim punktförmigen Auftrag weniger Substanz als beim strichförmigen.

Die R_F -Werte liegen bei der angewandten Trennung so weit auseinander, daß die Basen auch beim punktförmigen Auftragen hinreichend voneinander getrennt werden (Abb. 19).

2.4.4.2. Microcaps

Die verwendeten DC-Platten tragen eine 0,1 mm dünne Celluloseschicht, auf der beim Auftrag von 1 µl Lösung auf einmal ein Fleck entsteht, der für die Messung fast schon zu groß ist. Auf alle Fälle muß bei größeren Volumina in mehreren Malen aufgetragen werden.

Eine Reihe von Autoren hat sich mit dem Problem "Auftrag" beschäftigt (SHELLARD). Es sind spezielle Auftragskapillaren

(z.B. von JORK) entwickelt worden und aufwendige Apparaturen (Chromaplot von BRIDGER und RELPH). Solche Geräte standen nicht zur Verfügung.

Unter den verschiedenen Applikatoren für kleine Volumina wurden die Microcaps ausgewählt. Das sind Kapillaren mit definiertem Volumen, die im allgemeinen nach einmaliger Benutzung weggeworfen werden. Ihre Herstellungstoleranz wird vom Fabrikanten mit $\pm 2 - 3\%$ angegeben. Der Meßfehler der Kapillaren kann bei Bestimmungen des Mol-Verhältnisses, also nicht bei absoluten Mengenbestimmungen, ausgeschaltet werden, indem dieselbe Kapillare zum Auftragen der Analysenlösungen und der Vergleichslösung verwandt wird. Vor dem Aufziehen einer neuen Lösung wird die Kapillare mehrfach mit derselben durchgespült. Dieses wird auch vor dem ersten Auftrag mit einer neuen Kapillare durchgeführt, weil beim ersten Mal von der Glaswand der Kapillare etwas Substanz adsorbiert wird.

Beim Aufsaugen der Lösung in die Kapillare bleibt an der Außenseite etwas Lösung hängen. Versucht man diese abzuwischen, kann leicht etwas Lösung aus dem Inneren der Kapillare wieder herausgesaugt werden. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wird die Lösung mit dem einen Ende der Kapillare aufgesogen und mit dem anderen wird die Flüssigkeit auf die Platte aufgetragen.

Viele Autoren lassen die Analysenlösung auf die Platte auftropfen. Auch hierbei bleibt etwas Lösung an der Außenseite der Kapillare hängen (FAIRBAIRN). Diese Erscheinung des sogenannten "creep back" wird vermieden, wenn die Kapillare direkt auf die Celluloseschicht aufgesetzt wird und die Flüssigkeit gleich in die Schicht einzieht. Hierbei ist zwar eine leichte Beschädigung der Schicht nicht ganz auszuschließen, was aber auf die Ergebnisse keinen wesentlichen Einfluß hat.

2.4.4.3. Plattenvergleich

In den vorangegangenen Kapiteln wurde angesprochen, daß die Reproduzierbarkeit von der Auftragsmethode abhängig ist. Weitere Faktoren, die die Reproduzierbarkeit beeinflussen, sind

- a. Verletzung der Schicht beim Auftrag
- b. Trocknen der Flecken
- c. Fleckgröße
- d. Schichtdicke

Wenn alle Bedingungen für den Auftrag optimal erfüllt werden, wird das Verfahren so langwierig, daß für die Routinemethode der Aufwand in keinem Verhältnis mehr zum Ergebnis steht. Besonders die Applikation der Lösung ohne Beschädigung der Celluloseschicht ist schwierig und aus diesem Grunde wird - wie schon erwähnt - in Kauf genommen, daß die Schicht beim Auftrag leicht beschädigt wird.

Die Flecken werden mit kühlem Luftstrom getrocknet, damit die Celluloseschicht nicht austrocknet und die Basen irreversibel gebunden werden, sodaß sie nicht mehr laufen können (BUSH). Beim Auftragen wird darauf geachtet, daß die entstandene Fleckengröße möglichst gleichmäßig ist. Die Startflecken sollen im Durchschnitt einen Durchmesser von 5 - 6 mm aufweisen.

Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist außerdem stark ins Gewicht fallend eine gewisse Schwankung der Schichtbeschaffenheit (FAIRBAIRN), besonders wohl ihrer Dicke. Der folgende Vergleich zeigt in wieweit sich die genannten Faktoren auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auswirken. Auf 5 DC-Platten wurden 2 teilweise auch 3 verschiedene Konzentrationen einer Eichlösung aufgetragen. Die Zusammensetzung dieser Lösung ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

µl Eichlösung	enthalten nmol Base			
	Guanin	Adenin	Cytosin	Uracil
2	1,13	2,02	1,17	1,95
4	2,23	4,04	2,33	3,90
6	3,38	6,06	3,50	5,85

Tabelle 2: Zusammensetzung der Eichlösung
(in 40%iger Ameisensäure)

In der Tabelle 3 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Für jede Platte extra sind die Flächeneinheiten pro nmol mit der Streuung für jede Base ersichtlich. Die Abweichungen der Flächen wurde nach 3 Gesichtspunkten untersucht.

Es wurden die Streuungsmittel aller Läufe für jede Base extra errechnet (2. Spalte von rechts). Mit $\pm 15,6\%$ streuen die Werte für Cytosin am stärksten. Der Grund ist darin zu suchen, daß Cytosin mit 118 Flächeneinheiten pro nmol gegenüber den anderen Basen die kleinste Fläche aufweist und somit aus Gründen der Meßgenauigkeit am stärksten streut. Die mittlere Streuung aller Basen auf allen Platten beträgt $\pm 11,4\%$. In der untersten Spalte stehen links von der Doppellinie die Werte für die mittlere Streuung aller Basen für jede Platte einzeln. Das Mittel dieser Werte wiederum beträgt $\pm 5,6\%$ und ist identisch mit dem Mittel der Werte der ganz rechten vertikalen Spalte. In dieser Spalte sind die Mittelwerte der Streuung für die jeweiligen Basen der einzelnen Platten verzeichnet.

Der Vergleich demonstriert, daß die mittlere Streuung sämtlicher Basen auf sämtlichen Platten mit $\pm 11,4\%$ ungünstig ist. Nimmt man auf der anderen Seite jede Platte für sich und mittelt die Streuungen aller Basen pro Platte und errechnet hiervon das Mittel, so liegt der Wert mit $\pm 5,6\%$ um den Faktor 2 günstiger als der vorhergehende. Daraus ist zu schließen, daß die Platten trotz industrieller Serienfertigung nicht gleich sind. Man muß jede Platte für

sich behandeln - also für jede Platte extra Eichwerte anfertigen.

2.4.5. Abhängigkeit der Fläche von der Konzentration

Zur Bestimmung der Abhängigkeit von Fläche unter der Kurve von der Konzentration wurde eine Eichlösung bereitet, die sich in ihrem Molverhältnis an die natürlichen Gegebenheiten in der Ribonucleinsäure der Ratten anlehnt (Tab. 2).

Als Lösungs- und Elutionsmittel für die Basen und Nucleotide wird im allgemeinen 0,1 n Salzsäure verwendet. Die 4 Basen zeigen jedoch in der Salzsäure ein sehr schlechtes Lösungsverhalten, weshalb vor allem bei höheren Basenkonzentrationen die Substanz erst in einem Aliquot konzentrierter Ameisensäure gelöst wird und dann das restliche Volumen bis zu Erlangung einer 40 - 60% Ameisensäure mit Wasser aufgefüllt wird.

Die Abbildung 16 zeigt den Verlauf der Extinktionskurven. Im unteren Bereich weisen die Kurven eine geringere Krümmung und eine größere Steigung auf als in dem oberen Verlauf. Der flachere und gebogenere Kurvenverlauf bei höheren Konzentrationen ist für die quantitative Auswertung nicht so geeignet, wie der untere Teil. Der gekrümmte Kurvenverlauf wird zum Teil durch die KUBELKA-MUNK-Funktion mathematisch erklärt. Wird zu einer ideal weißen Schicht ganz wenig Ruß zugesetzt, sinkt die Helligkeit rapide. Bei weiterem Rußzusatz nimmt sie dann immer langsamer ab. Die Helligkeit oder auch der Remissionsgrad hängen logarithmisch von dem Rußzusatz ab. Dem Ruß entsprechen hier die Basen.

Die Abbildung 17 stellt die Eichkurven im unteren Konzentrationsbereich dar. Wie aus der Abbildung 18 ersichtlich ist, nimmt der Quotient Fläche zu Konzentration mit steigender Konzentration ungleichmäßig ab. Es besteht also keine lineare Abhängigkeit. Aber die Krümmung (Abb. 17) ist so schwach, daß man die Kurve als Gerade darstellen kann ohne die Abhängigkeit merklich zu verfälschen.

Platte:	1	2	3	4	5	Mittel gesamt	Mittlere Streuung der einzelnen Platten
GuanIn *	172	163	155	154	142	157	
Streuung ± %	6,6	6,7	7,3	3,0	5,0	8,3	5,7
AdenIn *	330	260	274	257	300	282	
Streuung ± %	9,4	3,8	1,7	2,5	2,1	10,6	3,9
Cytosin *	142	129	97	107	109	118	
Streuung ± %	9,1	12,2	9,4	2,5	4,7	15,6	6,7
Uracil *	192	156	150	145	158	160	
Streuung ± %	1,9	6,6	8,2	10,2	2,5	11,2	5,9
n	3	5	3	3	4	18	
Mittlere Streuung ± %	6,8	7,3	5,5	4,6	3,6	11,4	5,6

* FL.E. x nmol⁻¹ = Flächeneinheiten/nmol

Tabelle 3: Vergleich von 18 Trennungen auf 5 verschiedenen Platten mit 3 verschiedenen Konzentrationen (Tab. 2)

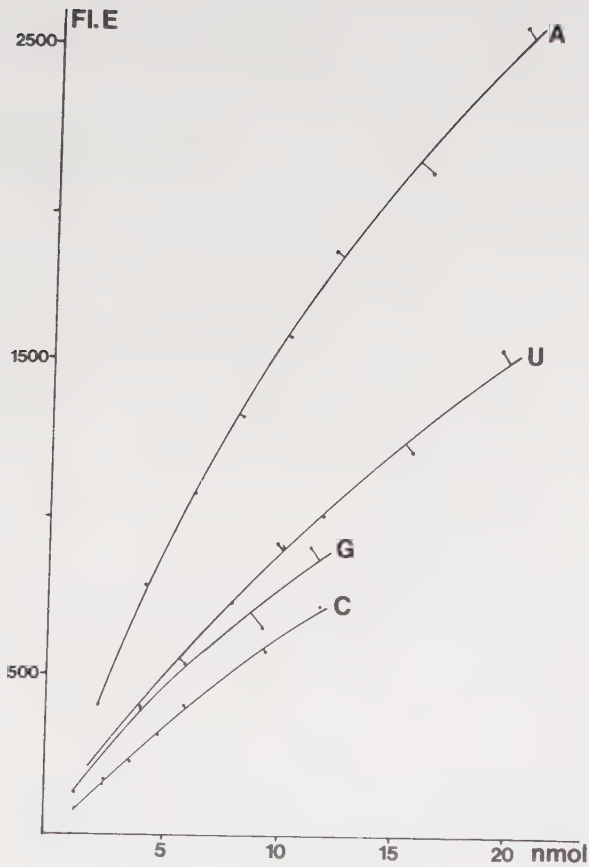


Abbildung 16:
Eichkurven für Adenin (A), Uracil (U), Guanin (G) und Cytosin (C) im Bereich von 1 - 20 nmol. Die Basen sind auf Cellulose-DC-Platten punktförmig aufgetrennt worden (s. Methodik).

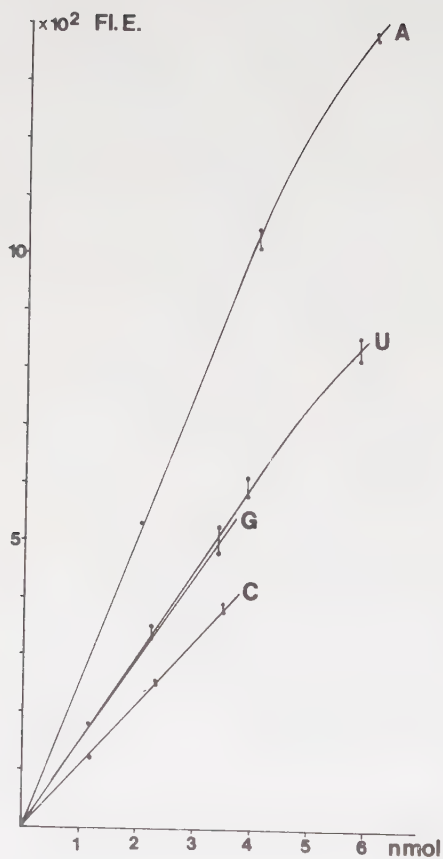


Abbildung 17:

Eichkurven für die Basen (wie in Abb. 16) im Bereich zwischen 1 - 5 nmol. Der Verlauf der Kurven durch den Nullpunkt wurde interpoliert.

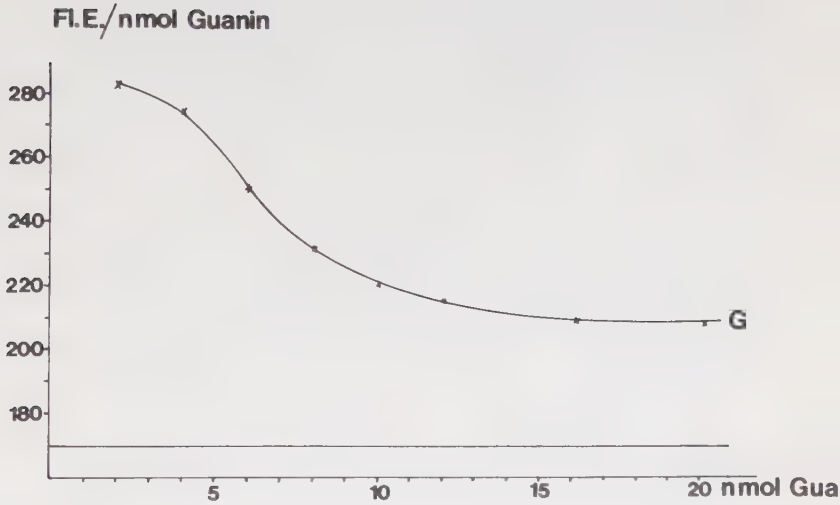


Abbildung 18:
Abhängigkeit des Quotienten aus Fläche zu Menge (in nmol)
von der Menge (in nmol) am Beispiel Guanin. Der Verlauf
der Kurve zeigt keine lineare Abhängigkeit. In dem Mess-
bereich von 1 - 4 nmol ist der Messfehler jedoch zu ver-
nachlässigen.

Dieses wurde der Bestimmung zugrundegelegt. Die obere Grenze des Meßbereiches liegt für Guanin bei 3 - 4 nmol, für Adenin bei 4 - 6 nmol, für Cytosin bei 3 - 4 nmol und Uracil bei 6 - 8 nmol pro Fleck.

Da die Eichgeraden durch den Nullpunkt verlaufen, hat es den Anschein, als existiere nach unten hin keine Begrenzung des Meßbereiches. Aber der methodische Fehler der Flächenmessung nimmt rapide zu, sobald die Fläche unter 90 - 100 Flächeneinheiten absinkt. Die untere Grenze liegt deshalb etwa bei 0,5 - 1 nmol pro Fleck.

Eine Gerade, die durch den Nullpunkt eines Koordinatensystems läuft, wird durch die Gleichung $y = ax$ dargestellt. Die Steigung "a" der Geraden wird für jede DC-Platte mit den Eichwerten extra ermittelt. Wie in Abbildung 16 und 17 zu sehen ist, entspricht die Fläche unter der Kurve der Ordinate "y" und die Menge in nmol der Abzisse "x".

Mit 3-fach Bestimmungen werden die Steigungen für jede Base und jede Platte bestimmt. "x" ist als Eichlösung bekannt und "y" wird als Kurvenfläche ermittelt. Aus diesen beiden Werten ergibt sich "a", indem man sie in die Formel $y = ax$ einsetzt.

Die Flächen der zu bestimmenden Base sollten möglichst nahe der Flächengröße der Eichbasen kommen, damit der Fehler möglichst gering wird, da die Eichkurven ja leicht gekrümmt und nicht gerade sind. Je näher die Flächen der Eichbasen und der zu bestimmenden Base beieinanderliegen, desto genauer wird die Messung.

Die Chromatogramme wurden bei 260 nm ausgewertet. Diese Wellenlänge ist zumindest für Cytosin mit einer maximalen Extinktion bei 275 nm nicht optimal und die Empfindlichkeit des Gerätes ließe sich durch Änderung der Wellenlänge um den Faktor 2 erhöhen.

2.4.5.1. Spaltlänge

Die Spaltlänge hat auf die Beziehung Absorption zu Fläche Einfluß. Ein Spalt, der nur das Zentrum der Fläche überstreicht, führt zu einer steileren Kurve für die Abhängigkeit von Absorption zu Fläche, als ein Spalt, der über die gesamte Breite reicht (EICH et al). Das erklärt sich aus dem Umstand, daß bei kurzer Spaltlänge der höchst konzentrierte Teil des Flecken abgetastet wird, während ein längerer Spalt die Randzonen mit erfaßt und die mittlere Konzentration - über die gesamte Spaltlänge veranschlagt - geringer ist. Das bedingt ein schwächeres Absorptionsgefälle und damit eine flachere Kurve zwischen dem background und der maximalen Absorption als bei einem kurzen Spalt.

Ein kürzerer Spalt liefert eine steilere Eichkurve, aus der sich die Abzissenwerte genauer ablesen lassen, insofern ist die Kürze von Nutzen. Sie hat aber auch einen Nachteil. Der kurze Spalt verfehlt leicht das Konzentrationszentrum, wenn er nicht sorgfältig zentriert wird, wodurch große Fehler entstehen können.

Es wurde deshalb ein Kompromiss eingegangen. Mit einer Spaltlänge von 8 mm wird der Fleck zu 70 - 80% seiner Breite überstrichen. Wird das Fleckzentrum nicht völlig symmetrisch überfahren, führt das zu keiner besonderen Änderung der Absorption.

Die Spaltbreite ergibt sich als Variable aus allen anderen Einstellungen des Gerätes. Sie beträgt 1 - 1,5 mm.

2.4.6. Rechnerische Korrektur der Basislinie

Eine Schwierigkeit der Auswertung der DC-Platten wurde bisher noch nicht erwähnt: Die Basislinie verläuft nicht gerade, sondern steigt zur Front hin progressiv an (Abb. 19). Der Grund dafür ist darin zu suchen, daß das stark saure Laufmittel einen gewissen Anteil der Cellulose hydrolysiert. Diese UV-Licht adsorbierenden Hydrolysate

werden in Richtung Front transportiert. 3 Wege gibt es, mit diesem Problem fertig zu werden:

- a. Zweistrahngerät
- b. rechnerische Korrektur
- c. quer zur Laufrichtung messen (SHELLARD)

Ideal ist ein Zweistrahngerät (PENNER, KNAPPSTEIN et al.). Bei diesem Gerät wird der Meßstrahl halbiert. Der eine Strahl fährt die Bahn mit den Substanzen ab und der andere eine benachbarte leere Bahn. Die Differenz zwischen den beiden Messungen ist die eigentliche Absorption, die von der Analysesubstanz verursacht wird. Da aber kein Zweistrahngerät zur Verfügung steht, mußte auf die rechnerische Korrektur zurückgegriffen werden.

Die Basiskurve verläuft gekrümmt. Auch hier wurde zur Vereinfachung der Berechnung die Kurve unter den peaks durch Teilgeraden ersetzt. Es kann auch hier unterstellt werden, wie bei der Eichgeraden für die Basen, daß ein hierdurch entstehender Fehler ausgeglichen wird, indem auf die Eichkurve dasselbe Verfahren angewandt wird.

In der Abbildung 19 erkennt man unter den Kurven jeweils ein Trapez. Seine Fläche entspricht der Adsorption der Platte ohne Basenfleck. Der Integrator mißt zwischen den senkrechten Trennstrichen die gesamte Kurvenfläche. Von dieser wird die Trapezfläche abgezogen, nachdem sie von Quadratzentimetern auf Flächeneinheiten, die sich aus der Gliederung des Schreiberpapiers ergeben, umgerechnet worden ist. Die Differenz stellt die eigentliche Adsorption dar.

Für die Berechnung eines Wertes werden mehrere Flecken ausgewertet, sodaß sich eine Fehlerrechnung anschließen kann.

Die rechnerische Korrektur erfordert viel Zeit. Zur Beschleunigung der Ausrechnung wurde deshalb eine programmierbare Rechenmaschine vom Typ Wang 370 eingesetzt. Folgende Werte werden in die Maschine

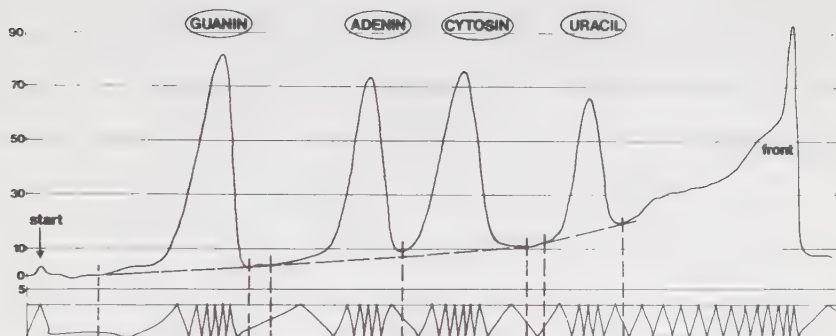


Abbildung 19:

Auswertung eines Basenchromatogrammes mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer. Die peaks werden von den gestrichelten Linien begrenzt, und die Zick-Zack-Linie zwischen ihnen ist ein Maß für die gesamte Fläche unter der Kurve. Die Basislinie steigt vom Start in Richtung Front an, so daß die Kurvenfläche einen Leerwert beinhaltet. Dieser Leerwert entspricht dem Trapez, das von der Basislinie, der Null-Linie und den beiden gestrichelten Vertikalen begrenzt wird. Die Trapezfläche wird von der gesamten Fläche subtrahiert.

eingegeben:

- a. gesamte Fläche
- b. Länge des Trapezes
- c. mittlere Höhe des Trapezes
- d. bei Eichwerten die Menge in nmol

Die Rechenoperation wird von Lochkarten gesteuert (Rechenprogramm siehe Anhang). Die eingegebenen Werte und die Ergebnisse werden ausgedruckt (Muster siehe Anhang). Zum Schluß liefert die Rechenmaschine eine Fehlerrechnung.

2.4.7. Beispiel

An einem Beispiel soll die beschriebene Methode demonstriert werden. Es soll die molare Zusammensetzung von RNA bestimmt werden, die aus dem Cytoplasma von Rattenleber nach der angegebenen Methode extrahiert wurde.

Auf der folgenden Seite sind die Ergebnisse der Bestimmung zusammengefaßt. 1a und 1b sind auf derselben Platte gelaufen. 1a und 2 stellen jeweils die doppelte Menge von 1b dar. Die Molverhältnisse der 4 Basen wurde aus 10 Läufen berechnet.

Die Streuung beträgt maximal $\pm 3,4\%$ (bei Guanin) für das vorliegende Molverhältnis. Die geringste Streuung weist Uracil mit $\pm 0,9\%$ auf. Die ermittelten Werte für Rattenleber-RNA stimmen mit den von ELSON und CHARGAFF angegebenen Werte überein.

2.4.8. Zusammenfassung

Die direkte Bestimmung des Molverhältnisses der Basen auf der DC-Platte liefert gute Ergebnisse, deren Streuung unter $\pm 4\%$ liegt. Für die 3-fach Bestimmung sind etwa 15 μg Nucleinsäure erforderlich. Es werden die Basenzusammensetzung sowohl von Ribonucleinsäure als

Beispiel:

			Molenbruch	
1a)	G	1,164	nmol	30,1%
	A	0,784	"	20,2%
	C	1,146	"	29,6%
	U	0,778	"	20,1%
		$\frac{G + C}{A + U}$		= 1,48
1b)	G	0,600	nmol	30,8%
	A	0,389	"	20,0%
	C	0,562	"	28,9%
	U	0,396	"	20,3%
		$\frac{G + C}{A + U}$		= 1,48

} auf derselben DC-Platte

2)	G	0,879	nmol	28,8%
	A	0,624	"	20,3%
	C	0,930	"	30,5%
	U	0,618	"	20,3%
		$\frac{G + C}{A + U}$		= 1,46

			Streuung
G	29,9	±	3,4%
A	20,2	±	1,2%
C	29,7	±	2,7%
U	20,2	±	0,6%

$$\frac{G + C}{A + U} = 1,47 \pm 0,9\%$$

auch von Desoxyribonucleinsäure ermittelt. Auf jeder DC-Platte sollen 3 Eichwerte mitlaufen, die gleichmäßig über die gesamte Startlinie verteilt sind. Die Konzentrationen der einzelnen zu analysierenden Basen müssen möglichst dicht bei den Eichwerten liegen. Je dichter sie beisammenliegen, desto genauer wird die Messung. Die Methode erfordert eine gewisse Einarbeitung und der Aufwand an Geräten ist nicht unerheblich: ein Chromatogramm-Spektralphotometer mit Integrationsschreiber und - worauf sich eher verzichten läßt - eine programmierbare Rechenmaschine.

Für größere Substanzmengen als 5 - 10 nmol pro Base ist die Methode nicht zugeschnitten. Der geringe Substanzverbrauch, der auf der einen Seite von Nutzen ist wirkt sich für die eigentliche Zielsetzung (2.4.1.1.) nachteilig aus, weil die geringen Mengen nicht die erforderliche Radioaktivität besitzen, um eine hinreichend genaue Bestimmung der spez. Akt. durchzuführen.

2.5. Zusammenfassung der Methodik und Fehlerbetrachtung

Es ist eine Methodik beschrieben worden, nach der ribosomale und transfer RNA aus dem Cytoplasma von Rattenembryonen gewonnen wird. Die RNA wird in ihre Subspezies aufgetrennt und anschließend wird die molare Zusammensetzung und die spezifische Aktivität der Nucleotide und Basen bestimmt.

Ein Versuch, das heißt eine Kontrollgruppe und ein bis drei Versuchsgruppen, erfordert vier bis sechs Wochen bis alle Arbeitsgänge durchgeführt worden sind.

Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Teilergebnisse ist unterschiedlich. Bei dem Umgang mit Tieren wird von vornherein eine sogenannte biologische Streuung* von $\pm 15\%$ zugrundegelegt. Allerdings zeigt besonders die Laugen-Säure-Fraktionierung, bei der jeder Ansatz aus einem Tier entnommen worden ist, daß die Streuung einschließlich methodischem Fehler ($\pm 5\%$) größer (z.B. säurelösliche Fraktion), aber auch geringer (z.B. RNA-Fraktion) sein kann.

Aufgrund der gewählten Versuchsanordnung kann die biologische Streuung nur teilweise berücksichtigt werden. Für Serum und Fruchtwasser liegen für jedes Tier Werte vor. Hier läßt sich eine Aussage über die biologische Streuung am besten treffen. Der methodische Fehler ist gering, weil die entsprechenden Arbeitsgänge einfach und zahlenmäßig gering sind.

Die Ergebnisse der Laugen-Säure-Fraktionierung nehmen eine Zwischenstellung ein. Es werden 3- oder 4-fach Bestimmungen durchgeführt. "n" ist also klein. Folglich sinkt die Genauigkeit einer Fehler-

*

Streuung:

Standardabweichung, Streuung der Meßwerte

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}}{N - 1}} = \text{S.D. standard deviation}$$

rechnung. Da die Anzahl der Arbeitsgänge gegenüber der Serumverarbeitung erheblich angewachsen ist, und die zu bestimmenden Werte teilweise an die Grenze ihres Meßbereiches rutschen, steigt der methodische Fehler. Er wird aber sicherlich noch von der biologischen Streuung überboten.

Bei der hier beschriebenen Analyse der Nucleinsäurebausteine fällt die biologische Streuung nicht ins Gewicht, weil alle Embryonen einer Versuchsgruppe in *e i n e m* Ansatz enthalten sind, von dem dann eine *D r e i*-fachbestimmung durchgeführt wird.

Die methodische Streuung beträgt für die Nucleotide $\pm 5\%$ und für die Basen, bei denen die Aktivitätsmessung an der Grenze des meßbaren liegt, ergibt sich eine Streuung von $\pm 10\%$. Diese Reproduzierbarkeit erscheint uns für unsere Fragestellung ausreichend.

3. Ergebnisse und Diskussion

=====

3.1. Einleitung

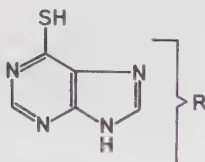
Vor gut 20 Jahren begannen systematische Untersuchungen über Purin- und Pyrimidin-Basenanaloga (HITCHINGS et al.). Dieser Gruppe von Pharmaka liegt folgendes Konzept zugrunde: Bausteine für die Nucleinsäuresynthese werden leicht abgewandelt (z.B. eine SH-Gruppe statt einer OH-Gruppe). Diese synthetischen Analoga wirken entweder als Hemmstoffe bestimmter enzymatischer Reaktionen, da das Analoge - wie der entsprechende Metabolit - eine Affinität zu dem betreffenden Ferment besitzt, selber jedoch nicht umgesetzt wird, oder die Antimetaboliten werden von bestimmten Enzymen der Zelle als solche nicht erkannt und irrtümlich wie der Metabolit umgesetzt. Dadurch kann der Antimetabolit anstelle des natürlichen Stoffwechselproduktes in z.B. Nucleinsäuren eingebaut werden und zur Bildung funktionsuntüchtiger Makromoleküle führen.

Mit Hilfe der erörterten Methodik wird der Einfluß zweier Basenanaloga auf die Synthese der RNA untersucht.

1. 6-Mercapto-Purin (6-MP) beeinflusst als Purinanalogs die Synthese von Adenin und Guanin und ihrer Folgeprodukte.
2. Cytosinarabinosid (ARA-C) hemmt die DNA-Polymerase, was hauptsächlich für eine verminderte DNA-Synthese verantwortlich ist.

Diese beiden Antimetaboliten haben Eingang in die Krebstherapie gefunden. Das Stoffwechselgleichgewicht wird durch sie empfindlich gestört. Für schnell wachsende Gewebe wie Tumore und Embryonen sind 6-MP und ARA-C toxisch, während sie vom ausgewachsenen Organismus einigermaßen toleriert werden.

3.2. 6-Mercaptopurin



6-MP



Hypoxanthin



Adenin

6-MP wurde 1952 von ELION, BURGI und HITCHINGS synthetisiert. Es ist eines der ersten Basenanaloge und mit am besten untersucht. Diese Substanz wird hier als erste in die Methode eingesetzt, weil erwartet wurde, daß man an den Purinen einen Effekt demonstrieren könnte, während er an den Pyrimidinen ausbleibt.

6-Mercaptopurin (6-MP) wird in der Tumorbehandlung bei Menschen angewendet. Es ist aber auch bekannt als teratogene Substanz. Die meisten Untersuchungen wurden bisher an Tumorgeweben in-vitro durchgeführt. Hauptsächlich aus diesen Versuchen weiß man, daß 6-MP die de-novo-Synthese der Purine sowohl zu einem frühen Zeitpunkt als auch zu einem späten Zeitpunkt stört.

Am Beginn der Purin-Synthese wird die Bildung von Phosphoribosylamin gestört und im späteren Verlauf dieser Synthese wird die Dehydrierung von Inosinmonophosphat (IMP) behindert. Weitere Möglichkeiten der Hemmung durch 6-MP wurden in Erwägung gezogen und ihre prinzipielle Möglichkeit bewiesen. Jedoch dürften die beiden beschriebenen Schritte für die Hemmung durch 6-MP mindestens im Tumorgewebe entscheidend sein. Bei embryonalem Gewebe liegen entsprechende Untersuchungen bisher nicht vor.

3.2.1. Vorversuche

3.2.1.1. Dosis und Zeitpunkt

MURPHY hat unter anderem auch mit 6-MP teratologische Untersuchungen an Ratten durchgeführt. Auf ihren Untersuchungen basierend, haben wir schwangeren Ratten am Tag 12 100 mg/kg 6-MP i.p. injiziert.

Die Applikation des 6-MP bereitet Schwierigkeiten, weil es sich in physiologischer Kochsalzlösung kaum löst. Um die Arzneiform einer Suspension zu umgehen - denn die Sedimentation führt zu fehlerhafter Dosierung - wurde das 6-MP in Propylenglycol gelöst und der zweifellos durch den zweiwertigen Alkohol bewirkte narkotisierende Effekt in Kauf genommen.

100 mg 6-MP sind in 5 ml Propylenglycol gelöst worden. Pro 200 g Ratte wurden 1 ml dieser Lösung injiziert.

3.2.1.2. Verteilung von 6-MP im Gewebe

Um einen Überblick zu bekommen, wie sich das 6-MP im Organismus der Ratten verteilt, wurde schwangeren Ratten an den Tagen 11, 12 und 13 ³⁵S-markiertes 6-MP appliziert. Die Embryonen und - als mütterliches Vergleichsgewebe - Leber und Niere wurden der Laugen-Säuren-Fraktionierung unterworfen (Tab. 4). Die Markierungsrate ist erwartungsgemäß am Tag 11 am höchsten. 12-Tage-Embryonen haben 6-MP weniger eingebaut und 13-Tage-Embryonen noch weniger. Bei Leber- und Nierengewebe liegen die 1-Std.-Werte für 12-Tage-Tiere höher als bei den 11-Tage-Tieren. Für 3 und 5 Std. Inkubationszeit werden für die beiden Tage annähernd gleiche Werte erzielt. Die Hauptmenge des Pharmakons (ca. 90 %) und seiner Metaboliten befindet sich in der säurelöslichen Fraktion, wo sie binnen 1 Std. zum größten Teil ausgeschieden wird.

Gewebe	Säurelösl.-Frak.		Lipide		RNA		Gly.-Gly.		DNA		Protein	
	Tag	min	dpm/ug DNA	%	dpm/ug DNA	%	dpm/ug DNA	%	dpm/ug DNA	%	dpm/ug DNA	%
Embryo	11	60	110 ± 25 %	100	2,8 ± 24 %	100	1,8 ± 7 %	100	6,7 ± 29 %	100	0,54 ± 13 %	100
		180	79 ±	70	3,4 ±	122	2,0 ±	115	3,8 ±	56	1,9 ±	357
	300		49 ± 1 %	44	1,2 ± 45 %	44	1,3 ± 11 %	75	4,3 ± 21 %	64	2,8 ± 3 %	524
		60	76 ± 24 %	100	2,3 ± 26 %	100	1,4 ± 14 %	100	3,5 ± 18 %	100	0,52 ± 22 %	100
	12	180	38 ± 19 %	50	1,2 ± 5 %	52	1,3 ± 18 %	91	2,1 ± 16 %	61	1,4 ± 9 %	267
		300	38 ± 19 %	50	0,7 ± 51 %	32	1,3 ± 1 %	96	2,6 ± 24 %	75	2,5 ± 8 %	485
	13	180	32 ± 11 %		0,8 ± 37 %		0,8 ± 5 %		1,6 ± 4 %		1,2 ± 30 %	
Leber	11	60	340	100	17	100	1,6	100	3,4	100	0,68	100
		180	180	55	6,1	39	1,1	65	3,8	113	0,63	93
	300		160	46	3,4	22	1,4	87	4,1	121	0,68	100
		60	970	100	21,0	100	1,8	100	3,7	100	1,1	100
	12	180	170	18	7,9	37	1,2	70	3,5	96	0,61	55
		300	165	17	3,7	18	1,8	103	3,8	103	0,63	57
Niere	11	60	1.190	100	14	100	2,5	100	2,6	100	1,3	100
		180	160	13	3,5	26	1,0	40	1,3	48	0,5	37
	300		35	3	2,2	16	0,77	31	2,3	88	0,5	38
		60	2.450	100	19	100	3,7	100	4,8	100	2,3	100
	12	180	94	4	3,6	19	0,91	25	1,4	30	0,6	26
		300	65	3	2,3	12	0,82	22	2,2	46	0,5	20

Tabelle 4: Laugen-Säuren-Fraktionierung unter Einwirkung von ³⁵S-6-MP (100 mg/kg, 3,21 dpm/nmol, gelöst in 5 ml Propylen-glycol, i.p. appliziert). Embryonales sowie mütterliches Gewebe werden zu verschiedenen Entwicklungsstadien miteinander verglichen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 verschiedenen Präparationen (in dpm/ug DNA). Der 1-Stunden-Wert wurde = 100 % gesetzt. (Gly.-Gly. = Glycosaminoglycane)

Den Ratten wurden 100 mg ^{35}S -markiertes 6-MP/kg mit einer spez. Akt. von 3,21 dpm/nmol injiziert. Aus der spez. Akt., die nach 60 Min. im 12-Tage-Embryo wiedergefunden wurde, soll die Größenordnung der Konzentration des 6-MP im Embryo ermittelt werden:

Die Summe aller dpm/ μg DNA in allen Fraktionen beträgt 85 dpm/ μg DNA. Für die Annahme, daß ein 12-Tage-Embryo $\approx 70 \mu\text{g}$ DNA $\approx 15 \text{ mg}$ Feuchtgewicht $\approx 15 \mu\text{l}$ Flüssigkeit entspricht, ergibt sich eine Konzentration des 6-MP im embryonalen Gewebe von

$$\text{ca. } 10^{-7} \text{ M.}$$

Zum Vergleich sind in der Tabelle 6 einige Werte aufgeführt, die in in-vitro-Versuchen ermittelt wurden (ELION 1967):

	K_i 6-MP	Reaktion wichtig für die Bildung von
IMP $\longrightarrow$ SAMP	$3,0 \times 10^{-4} \text{ M}$	Adenin
IMP $\longrightarrow$ XMP	$3,6 \times 10^{-6} \text{ M}$	Guanin
PRPP $\longrightarrow$ Phosphoribosylamin	$4,4 \times 10^{-5} \text{ M}$	Adenin und Guanin

Tabelle 6: K_i -Werte für 6-MP nach ELION (1967)

Nach der intraperitonealen Injektion sammelt sich in der Bauchhöhle der Ratten eine Flüssigkeit (Ascites) an, was auf osmotische Erscheinungen zurückzuführen sein wird. Die Radioaktivität pro ml wurde gemessen (Tab. 5). Nach drei Stunden hatte die Aktivität um 80 % abgenommen.

Diese Abnahme um 80 % muß sehr zurückhaltend gedeutet werden. Da

Tag	Zeit (min.)	Ascites dpm/ μ l	60 min.-Wert $\pm$ 100 %	n
11	60	3.700 $\pm$ 18 %	100 %	3
	180	770 $\pm$ 21 %	21 %	3
	300	290 $\pm$ 10 %	8 %	3
12	60	4.300 $\pm$ 9 %	100 %	2
	180	960 $\pm$ 26 %	22 %	3
	300	400 $\pm$ 25 %	9 %	3
13	180	690 $\pm$ 2 %	---	2

Tabelle 5: Radioaktivität im Ascites nach Applikation von ^{35}S -6-MP. (Versuchsbedingungen s. Legende der Tab. 4).

nicht bestimmt werden konnte, in wieviel ml Bauchflüssigkeit sich die Radioaktivität verteilt, ergibt sich eine große Unsicherheit bei der Interpretation. Dennoch kann vermutet werden, daß das 6-MP schnell resorbiert wird. Die Versuche mit den radioaktiv markierten Substanzen (^{35}S -6-Mercaptopurin und ^3H -Cytosinarabinosid) sowie die Säuren-Laugen-Fraktionierungen sind gemeinsam mit GERD BOCHERT durchgeführt worden.

Tab. 4 zeigt, daß zwischen der Markierungsrate der Ribonucleinsäure am Tag 11 und Tag 12 hinsichtlich der ^{35}S -Markierung kein großer Unterschied besteht. Dagegen sind die entsprechenden Werte am Tag 13 deutlich geringer. Aus den in 1.1. angeführten Gründen werden die Untersuchungen mit dem 6-MP am Tage 12 durchgeführt, zumal auch MURPHY zu diesem Zeitpunkt gearbeitet hat.

3.2.2. Begleitende Kontrollbestimmungen (Tag 11)

Wie die begleitenden Kontrollversuche zeigen, sind die Tiere den Möglichkeiten entsprechend einheitlich markiert. Die Versuchsgruppen am Tag 11 der Schwangerschaft wurden nur mit ^{14}C -Glucose behandelt, während die Gruppen am Tag 12 zusätzlich ^{32}P -Ortho -Phosphat erhielten.

3.2.2.1. Serum

Bei der Kontrollgruppe wurde die Radioaktivität im Serum 3 Std. nach Gabe der radioaktiv markierten Vorstufen mit $750 \pm 12 \%$ dpm/ μl bestimmt. Nach der fünfstündigen Einwirkung von 6-MP wurden $840 \pm 13 \%$ dpm/ μl festgestellt. (3 Std. vor dem Decapitieren erhielt auch diese Gruppe die radioaktiv markierten Präkursoren.)

3.2.2.2. Laugen-Säuren-Fraktionierung

Die Laugen-Säuren-Fraktionierung liefert einen Überblick über die Verteilung der Aktivität in den verschiedenen compartments. Wichtig ist es, die spez. Akt. in der säurelöslichen Fraktion von Kontroll- und Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen. In dieser Fraktion befindet sich sozusagen der Vorrat, aus dem die anderen Fraktionen für ihre Synthese schöpfen. Ist die spez. Akt. in der säurelöslichen Fraktion gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, so führt das ebenfalls zu erhöhten spez. Akt. in den anderen Fraktionen.

Tab. 7 zeigt, daß das Aktivitätsniveau in beiden säurelöslichen Gruppen praktisch gleich ist. Deshalb kann man die übrigen Fraktionen ohne weiteres miteinander vergleichen.

In allen nicht-säurelöslichen Fraktionen ist eine verminderte Einbaurate der Glucosefragmente zu beobachten. Am stärksten ausgeprägt ist dieser Effekt bei den Nucleinsäure-Fractionen. Vergleicht man sie mit den Kontrollen, so zeigt die RNA-Fraktion nur noch 60 % des Einbaues und die DNA-Fraktion nur geringfügig mehr, während sich bei den übrigen Fraktionen der Einbau auf 80 - 90 % der Kontrollen beläuft.

3.2.3. Hauptversuch

3.2.3.1. Nucleotide

Die Nucleotide der 28s und 18s RNA lassen eine Hemmung des Einbaus von ca. 50 % erkennen. Bei den 4s-Nucleotiden ist die Hemmung etwas geringer (Tab. 8).

Säurelösl. Fr. Streuung $\pm$ %	Kontrolle dpm/ μ g DNA	5 h dpm/ μ g DNA	% d. Ko.
	366 33	402 18	110 %
Lipide Streuung $\pm$ %	147 16	117 26	80 %
RNA Streuung $\pm$ %	117 6	74 9	63 %
Gly.-Gly. Streuung $\pm$ %	51 17	45 16	88 %
Amylase Streuung $\pm$ %	24 21	24 12	100 %
DNA Streuung $\pm$ %	60 14	43 18	72 %
Protein Streuung $\pm$ %	68 21	55 14	88 %
μ g RNA μ g DNA	3,9 $\pm$ 20 %	4,2 $\pm$ 1 %	

Tabelle 7: Laugen-Säuren-Fraktionierung 11-Tage alter Embryonen nach der intraperitonealen Applikation von 100 mg 6-MP/kg (100 mg 6-MP in 5 ml Propylenglycol gelöst) 5 Std. vor der Decapitation. 2 Std. nach Applikation des Pharmakons erhielten die Muttertiere 1 mCi ^{14}C -u-Glucose/kg (230 mCi/nmol) intravenös injiziert.

		Kontrolle dpm/nmol.	5 h dpm/nmol.	Kontrolle $\pm$ 100 %
28s	GMP	36,9	21,2	58 %
	AMP	28,5	16,5	58 %
	CMP	26,1	12,5	48 %
	UMP	35,1	20,3	58 %
18s	GMP	41,7	22,7	54 %
	AMP	--	--	--
	CMP	--	--	--
	UMP	46,3	22,5	49 %
4s	GMP	39,3	25,1	64 %
	AMP	36,2	25,1	69 %
	CMP	34,1	19,2	56 %
	UMP	38,6	25,8	67 %

Tabelle 8: Spezifische Aktivität der Nucleotide, die nach Gradienten-Zentrifugation aus ribosomaler (28s und 18s) und aus transfer RNA (11-Tage-Embryonen) isoliert wurden. Die Trennung der Nucleotide erfolgte durch Hochspannungselektrophorese. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen für Tab. 7

3.2.4. Begleitende Kontrollbestimmungen (Tag 12)

3.2.4.1. Serum

	n	^{14}C dpm/ μl	^{32}P dpm/ μl
Kontrolle	15	$670 \pm 18 \%$	$350 \pm 13 \%$
3 h	14	$890 \pm 16 \%$	$360 \pm 10 \%$
5 h	14	$820 \pm 15 \%$	$280 \pm 15 \%$

Tabelle 9: Mittelwerte der Seren nach 6-MP-Behandlung (100 mg/kg in 5 ml Propylenglycol, 3 und 5 Std. Einwirkungszeit, intraperitoneal). Eine Mischung von je 1 mCi/kg ^{14}C -u-Glucose und ^{32}P -Ortho-Phosphat (trägerfrei) wurde den Mäusen 3 Std. vor Decapitation intravenös injiziert.

3.2.4.2. Fruchtwasser

Vom Fruchtwasser wurde der säurelösliche Anteil gemessen. Beim Absaugen des Fruchtwassers läßt es sich manchmal nicht ganz vermeiden, daß etwas Blut mitgenommen wird. Das führt zu einer stärkeren Schwankung der Streuung dieser Werte.

	n	^{14}C dpm/ μl	^{32}P dpm/ μl
Kontrolle	15	$70 \pm 21 \%$	$46 \pm 11 \%$
3 h	14	$84 \pm 20 \%$	$47 \pm 10 \%$
5 h	14	$73 \pm 26 \%$	$51 \pm 13 \%$

Tabelle 10: Mittelwerte des Fruchtwassers nach 6-MP-Behandlung (Versuchsbedingungen wie Legende Tab. 9).

3.2.4.3. Laugen-Säuren-Fraktionierung

Die Tabelle 11 zeigt die Werte für den Einbau von ^{14}C -Glucose in verschiedene Zellkomponenten nach 3, 5, 15 Stunden. Die Werte liegen zumeist im Bereich der Kontrollwerte. Nur die RNA-Fraktion und der Einbau in Kohlehydrate ist nach dreistündiger Einwirkungszeit eindeutig gehemmt. Alle säureunlöslichen Fraktionen zeigen 15 Std. nach Gabe des Pharmakons eine überschießende Reaktion.

Die Tabelle 12 führt die Werte für den ^{32}P -Phosphateinbau auf. Die stärkste Hemmung tritt hier bei 5 Std. auf, und nach 15 Std. liegen die Werte ebenfalls über den Kontrollen.

Das Verhältnis $\mu\text{g RNA}/\mu\text{g DNA}$ ist unter Normalbedingungen ein Maßstab für die Ausführung der Präparation der Embryonen und die quantitative Bestimmung von DNA und RNA. Dieser Quotient ist ein konstanter Wert mit einer Streuung von meist weniger als $\pm 10\%$. Ein aus dem Rahmen fallender Wert kann seine Ursache in der Mitnahme der Dezidua haben, was eine mangelhafte Präparation bedeutet oder eine fehlerhafte Ausführung der colorimetrischen Bestimmung nach BURTON für DNA und MEIBAUM für RNA.

Tag 11	$4,0 \pm 10\%$	(n = 4)
Tag 12	$1,2 \pm 6\%$	(n = 27)
Tag 13	$0,8 \pm 10\%$	(n = 4)

Tabelle 13: Verhältnis von $\mu\text{g RNA}$ zu $\mu\text{g DNA}$ in Rattenembryonen verschiedener Entwicklungsstadien

Darüber hinaus erhält man eine Information, ob sich das Verhältnis der Nucleinsäuren zueinander unter der Einwirkung des Pharmakons verändert hat oder nicht. Nach der Applikation von 100 mg 6-MP/kg verändert sich dieses Verhältnis nicht.

	Kontrolle dpm/ μ g DNA	3 h	% d. Ko.	5h dpm/ μ g DNA	% d. Ko.	15 h dpm/ μ g DNA	% d. Ko.
Säurelösli. Fr. Streuung $\pm$ %	325 12	312 21	96 %	346 17	107 %	354 12	109 %
Lipide Streuung $\pm$ %	121 7	107 10	89 %	104 15	86 %	146 16	121 %
RNA Streuung $\pm$ %	68 7	54 13	79 %	58 9	85 %	82 15	120 %
Gly.-Gly. Streuung $\pm$ %	15,5 7	13,7 9	88 %	15,2 10	98 %	19 14	123 %
Amylase Streuung $\pm$ %	15 6	12,1 4	81 %	14,9 8	99 %	23 8	155 %
DNA Streuung $\pm$ %	47 6	41 12	88 %	42 11	90 %	55 20	117 %
Protein Streuung $\pm$ %	86 8	73 8	85 %	83 10	97 %	108 14	125 %

Tabelle 11: Laugen-Säuren-Fraktionierung 12 Tage alter Embryonen nach 3, 5 und 15 Stunden andauernder Einwirkung von 6-MP (Versuchsbedingungen s. Legende der Tab. 9). Die Werte geben den Einbau der ^{14}C -Glucose-Fragmente an (^{32}P -Orthophosphat-Einbau s. Tab. 12). Die einzelnen Werte sind Mittelwerte aus drei Versuchen.

	Kontrolle dpm/ μ g DNA	3 h	% d. Ko.	5 h dpm/ μ g DNA	% d. Ko.	15 h dpm/ μ g DNA	% d. Ko.
Säurelös. Fr. Streuung $\pm$ %	355 10	328 9	92 %	294 13	83 %	405 8	114 %
Lipide Streuung $\pm$ %	9,1 16	7,3 15	80 %	6 16	66 %	10 23	113 %
RNA Streuung $\pm$ %	49 7	38 16	78 %	32 14	65 %	51 12	104 %
Gly.-Gly. Streuung $\pm$ %	8 9	6,4 17	80 %	5,6 15	70 %	9,4 17	117 %
Amylase Streuung $\pm$ %	2,2 6	1,6 6	73 %	1,6 10	73 %	2,5 4	114 %
DNA Streuung $\pm$ %	22 9	17 19	79 %	14 16	62 %	22 29	102 %
Protein Streuung $\pm$ %	4,1 6	3,1 16	76 %	2,7 10	66 %	4,5 18	110 %

Tabelle 12: Laugen-Säuren-Fraktionierung; Einbau von ^{32}P -Orthophosphat; (Versuchsdingungen s. Legende der Tab. 11).

Kontrolle	$1,14 \pm 1 \%$	n = 4
3 h	$1,17 \pm 5 \%$	n = 4
5 h	$1,13 \pm 4 \%$	n = 4

Tabelle 14: Das Verhältnis von $\mu\text{g}/\text{RNA}$ zu $\mu\text{g}/\text{DNA}$ nach der Applikation von 100 mg 6-MP/kg in 12-Tage-alten Rattenembryonen. (Versuchsbedingungen siehe Legende Tab. 9)

3.2.5. Hauptversuch

3.2.5.1. Nucleotide

Nach einer Einwirkungszeit von 3 Std. ist die Hemmung hauptsächlich auf die Purine beschränkt (Tab. 15). Nach 5 Std. entsprechen alle Versuchswerte den Kontrollen und nach 15 Std. schießen die spez. Akt. der Purin-Nucleotide über die Kontrollwerte hinaus. Auch hier, wie bei dem 11-Tage-Versuch hinkt die Hemmung von CMP hinter den anderen Nucleotiden hinterher.

Die Werte für ^{32}P -Phosphat verhalten sich recht gleichmäßig. Bei 3 und 5 Std. beträgt die Hemmung 70 bis 80 %, während sie für die 15-Std.-Werte den Kontrollen wieder recht nahe gekommen sind.

3.2.5.2. Basen

Die spez. Akt. der Basen wurde von der ribosomalen RNA der Kontrollgruppe der 3-Std.-Gruppe und der 5-Std.-Gruppe bestimmt (Tab. 16).

Die spez. Akt. der Basen ist erheblich geringer als die der Nucleotide, die eine um das zehnfache höhere Aktivität besitzen. Auch bei der Markierung der Basen ist, wie bei den Nucleotiden, eine Hemmung festzustellen. Nach 3 Std. sind alle 4 Basen auf zwei Drittel der Kon-

	Kontrolle	3 h		5 h		15 h	
	dpm/nmol $\pm S$ %	dpm/nmol $\pm S$ %	Kontrolle $\hat{=}$ 100 %	dpm/nmol $\pm S$ %	Kontrolle $\hat{=}$ 100 %	dpm/nmol $\pm S$ %	Kontrolle $\hat{=}$ 100 %
^{14}C	GMP	18,9	12,3	65 %	17,4	22,3	118 %
	AMP	14,9	11,3	76 %	15,2	18,8	126 %
	CMP	12,3	10,1	82 %	10,7	13,2	107 %
	UMP	19,3	17,8	92 %	18,0	22,6	117 %
		± 5 %	± 5 %		± 5 %	± 5 %	
^{32}P	GMP	6,33	4,30	68 %	4,60	5,76	91 %
	AMP	7,61	5,60	74 %	5,68	7,76	102 %
	CMP	6,67	4,86	73 %	4,85	5,80	87 %
	UMP	7,23	5,26	73 %	5,13	6,51	90 %
		± 5 %	± 5 %		± 5 %	± 5 %	

Tabelle 15: Spezifische Aktivität der Nucleotide, die nach Gradienten-Zentrifugation aus ribosomaler RNA am Tag 12 isoliert wurden. (Versuchsbedingungen s. Legende der Tab. 9).

	dpm/nmol. Kontrolle	dpm/nmol. 3 h	% d. Ko.	dpm/nmol. 5 h	% d. Ko.
Guanin	1,29 ± 7 %	0,86 ± 9 %	67 %	1,11 ± 7 %	86 %
Adenin	1,33 ± 2 %	0,81 ± 15 %	61 %	1,38 ± 10 %	104 %
Cytosin	1,05 ± 7 %	0,72 ± 8 %	69 %	0,68 ± 4 %	65 %
Uracil	3,95 ± 5 %	2,50 ± 9 %	63 %	2,59 ± 4 %	66 %

Tabelle 16: Spezifische Aktivität der Basen, die nach Gradienten-Zentrifugation aus ribosomaler RNA am Tag 12 isoliert wurden. (Versuchsbedingungen s. Legende der Tab. 9)

trollwerte gehemmt. Bei Cytosin und Uracil ändert sich nach 5 Std. nichts, während sich die spez. Akt. des Adenins normalisiert hat. Guanin nimmt eine Zwischenstellung ein.

3.2.6. Zusammenfassung

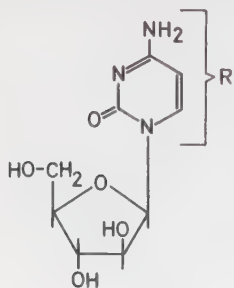
Der 12-Tage-Versuch zeigt für die Nucleotide eine hauptsächlich auf die Purine beschränkte Hemmung, während sie bei den 11-Tage-Embryonen generalisiert ist. Die stärkste Hemmung zeigen am Tag 12 die 3-Std.-Werte. Es ist nicht auszuschliessen, daß das Maximum der Hemmung noch davor liegt.

5 Std. nach der Injektion ist die Hemmung des Einbaus in die Nucleotide nicht mehr zu entdecken. Die spez. Akt. der Phosphatgruppe ist aber noch unvermindert gehemmt. Erst nach 15 Std. haben die Werte sich normalisiert bis auf Adenosin und Guanin - die beiden Purine - deren spez. Akt. die Kontrollgruppe übertreffen. Bei den Basen besteht die Hemmung auch noch 5 Std. nach der Applikation mit Ausnahme des Adenin.

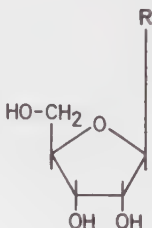
Wenn das Pharmakon 3 Std. vor der Untersuchung appliziert wird, ist eine eindeutige Hemmung erkennbar. 5 oder 15 Std. vorher verabreicht läßt sie sich in den Nucleotiden kaum noch feststellen. Die kurze Zeit von 3 Std. muß also ausreichen, um Induktionsprozesse, die für das Wachstum und die Differentiation des Embryos zuständig sind, nachhaltig zu stören.

Die Hemmung der spez. Akt. in den Phosphatgruppen liefert weitere Informationen über die Art der embryotoxischen Wirkung, da es mit den beiden Präkursoren möglich ist, zwischen *de-novo*-Synthese und *salvage*-pathway zu differenzieren. Aus den Ergebnissen ist zu schliessen, daß 6-MP auf beide Synthese-Wege wirkt. Die Hemmung scheint aber für die beiden Wege nicht synchronisiert zu sein.

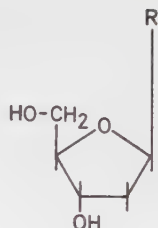
3.3. 1-β-D-Arabinofuranosylcytosin (ARA-C)



Arabinosylcytosin



Ribosyl-R.



Desoxyribosyl-R.

Die drei Verbindungen unterscheiden sich lediglich in der OH-Gruppe am C-2 des Zuckers.

ARA-C hemmt die DNA-Synthese (YOUNG et al.) aber nicht die der RNA (CARDELLHAC et al., FURTH et al., MOMPARTLER). Diese Ergebnisse wurden jedoch an Tumorgewebe gewonnen und sind nicht unbedingt auf den Embryo zu übertragen.

ARA-C wird aus drei Gründen mit dieser Methode untersucht:

a.) Wenn ARA-C - wie am Tumorgewebe - auch am Embryo die RNA-Synthese nicht beeinträchtigt, muß sich entsprechendes auch für die einzelnen Bausteine nachweisen lassen (sozusagen "negative Kontrolle").

b.) Es wäre jedoch interessant zu verfolgen, ob der Stoffwechsel embryonalen Gewebes Besonderheiten aufweist und hier ARA-C einen anderen Effekt entfaltet.

c.) Aus einem Versuchsansatz wird aus der Kernfraktion in einer parallel laufenden Arbeit (BOCHERT a.) die DNA untersucht und aus der cytoplasmatischen Fraktion in dieser Arbeit die RNA. Für die Untersuchung der Hemmung in der DNA ergab sich - als Pendant - die RNA-Analyse.

3.3.1. Vorversuche

3.3.1.1. Dosis und Zeitpunkt

Die Versuche wurden am Tag 12 vorgenommen. Schwangere Ratten wurden in diesem Stadium mit 10 mg, 30 mg und 100 mg ARA-C/kg behandelt.

Eine Gegenüberstellung der Quotienten $\mu\text{g RNA} / \mu\text{g DNA}$ zeigt, daß mit steigender Konzentration ARA-C relativ mehr RNA oder weniger DNA gebildet wird.

Kontrolle	$1,20 \pm 6 \%$	(n = 6)
10 mg/kg	$1,26 \pm 6 \%$	(n = 5)
30 mg/kg	$1,40 \pm 5 \%$	(n = 5)
100 mg/kg	$1,45 \pm 7 \%$	(n = 5)

Tabelle 17: Verhältnis der Quotienten $\mu\text{g RNA} / \mu\text{g DNA}$ unter Einwirkung verschiedener Konzentrationen ARA-C bei 12-Tage-alten Rattenembryonen.

Bei 30 mg ARA-C/kg ist eine eindeutige Veränderung des Quotienten festzustellen, der mit dem Wert nach der Gabe von 100 mg/kg fast identisch ist. Zur Erlangung eines eindeutigen Effektes wurde den Ratten 100 mg ARA-C/kg (in physiologischer Kochsalzlösung) injiziert.

3.3.1.2. Verteilung des ARA-C

Für die Untersuchungen der Verteilung des Tritium-markierten ARA-C's wurde die Laugen-Säuren-Fraktionierung nur teilweise durchgeführt (Tab. 18). Für Lipide, Glycosaminoglycane und Proteine war eine Markierung bedeutungslos. Deshalb wurden diese Fraktionen nicht ausgewertet. Die Zählergebnisse für die RNA und DNA-Fraktionen wiesen praktisch keine Radioaktivität aus. Es ist sehr wahrscheinlich, daß

dpm / μ l		LAUGEN - SÄUREN - FRAKTION. dpm / μ g DNA		
SERUM ÜBERSTAND	FR.W. ÜBERSTAND	EMBRYO (3 E.)	NIERE	ZEIT
1140 $\pm$ 15 %	106 $\pm$ 10 %	39 $\pm$ 15 %	410 $\pm$ 11 %	10 min
1210 $\pm$ 6 %	172 $\pm$ 7 %	49 $\pm$ 18 %	432 $\pm$ 8 %	30 "
810 $\pm$ 4 %	306 $\pm$ 7 %	71 $\pm$ 18 %	302 $\pm$ 12 %	60 "
320 $\pm$ 9 %	360 $\pm$ 9 %	91 $\pm$ 13 %	105 $\pm$ 19 %	180 "
160 $\pm$ 12 %	304 $\pm$ 7 %	69 $\pm$ 3 %	46 $\pm$ 11 %	300 "

Tabelle 18:

Radioaktivität im säurelöslichen Anteil von Fruchtwasser, Embryo und mütterlichem Serum und Nierengewebe nach intraperitonealer Applikation von 100 mg ^3H -Cytosinarabinsid / kg (spez. Akt. 1,22 mCi/mol). Siehe auch BOCHERT.

ARA-C nur zu einem sehr geringen Prozentsatz in die DNA eingebaut wird (CHU et al., COHEN, FURTH et al.). Die Radioaktivität beschränkt sich fast ausschließlich auf die säurelösliche Fraktion.

Das ARA-C wurde i.p. injiziert, weshalb das Maximum im Serum nicht sofort sondern erst 30 Min. nach der Injektion auftritt (Abb. 20). Der Aktivitätsanstieg und -abfall verläuft beim Serum und der Niere gleichartig. Entsprechendes gilt in größeren Grenzen auch für die säurelöslichen Anteile des Fruchtwassers und der Embryonen.

12 Tage alte Embryonen haben ein Feuchtgewicht von etwa 15 mg. Für die folgende Umrechnung wurde unterstellt, daß diese 15 mg 15 µl entsprechen sollen bei über 90 % Wassergehalt des Gewebes (KÖHLER). Die Embryonen enthalten durchschnittlich 60 µg DNA. Die Rechnung ist eine grobe Annäherung an die natürlichen Verhältnisse und ist deshalb möglich, weil sich die gesamte Aktivität in der säurelöslichen Fraktion befindet (Tab. 19, Abb. 20).

Nach zehnminütiger Einwirkung des markierten Pharmakons beträgt die Aktivität im Fruchtwasser etwa 60 % derjenigen im Embryo. 20 Min. später beläuft sie sich auf etwa 75 %, und von einer Stunde an kann man unterstellen, daß sich das Konzentrationsgefälle ausgeglichen hat. Dieser Befund spricht dafür, daß das Pharmakon nicht aus dem Serum über das Fruchtwasser in den Embryo gelangt, sondern daß es durch das Dottersackepithel bzw. die in ihrer Funktion gerade einsetzende Placenta erst in den Embryo und dann erst in das Fruchtwasser eindringt.

3.3.2. Begleitende Kontrollbestimmungen

3.3.2.1. Serum

Nach der Einwirkung von ARA-C liegt die ^{14}C -Radioaktivität in der Versuchsgruppe 40 % höher als in der Kontrollgruppe.

Zeit	Fruchtw. dpm/ μ l	Embryo dpm/ μ l [⊗]	% spez. Akt. d. Fruchtw. (Embryo $\hat{=}$ 100 %)
10 min	106	182	58 %
30 "	172	229	75 %
60 "	306	331	92 %
180 "	360	425	85 %
300 "	304	322	94 %

Tabelle 19:

Radioaktivität des ^3H -markierten ARA-C im Fruchtwasser und den Embryonen in Abhängigkeit von der Zeit. 12-Tage-Embryonen haben ein Feuchtgewicht von 15 mg (KÜHLER).

[⊗] 1 Embryo Tag 12 $\hat{=}$ 70 μ g DNA $\hat{=}$ 15 mg Feuchtgewicht $\hat{=}$ 15 μ l, Versuchsbedingungen s. Legende der Tab. 18.

	^{14}C -Aktivität			^{32}P -Aktivität		
	Kontrolle dpm/ μg DNA	5 h dpm/ μg DNA	% d.Ko.	Kontrolle dpm/ μg DNA	5 h dpm/ μg DNA	% d.Ko.
Säurelös. Fr. Streuung $\pm$ %	112 3	226 20	201 %	366 11	456 19	125 %
Lipide Streuung $\pm$ %	76 12	158 19	207 %	11 8	12 18	110 %
RNA Streuung $\pm$ %	60 13	91 21	154 %	58 11	56 16	96 %
Gly.-Gly. Streuung $\pm$ %	13 7	23 17	180 %	10 10	10 12	99 %
DNA Streuung $\pm$ %	40 11	26 21	68 %	29 9	7,6 16	27 %
Protein Streuung $\pm$ %	75 7	148 13	198 %	4,4 1	4,4 13	100 %

Tabelle 20:

Laugen-Säuren-Fraktionierung 12 Tage alter Embryonen nach 5-stündiger Einwirkung von 100 mg ARA-C/kg i.p.
Applikation der markierten Precursoren wie in d. Legende der Tab. 9.

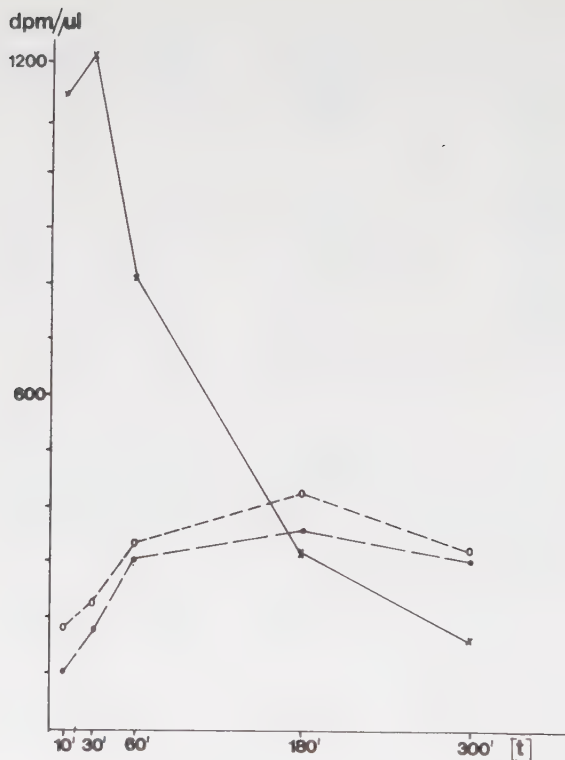


Abbildung 20:

Kurvenverlauf nach intraperitonealer Applikation von ^3H -Cytosinarabinosid (100 mg/kg; 500 $\mu\text{Ci/kg}$) im Serum (x--x), Fruchtwasser (o--o) und Embryo (o--o). Um die Radioaktivität im embryonalen Gewebe mit Serum und Fruchtwasser vergleichen zu können, wurde das Feuchtgewicht der Embryonen (am Tag 12 15 mg; 90 % Wasser) in μl ausgedrückt. Nach der intraperitonealen Injektion ist das Maximum der Radioaktivität im Serum erst nach 30 min. erreicht. Die Konzentration des Pharmakons im embryonalen Gewebe und im Fruchtwasser ist im Zeitraum von 1 - 5 Std. ziemlich konstant, obwohl die Konzentration im mütterlichen Serum in derselben Zeit stark absinkt.

	^{14}C dpm/ μl	^{32}P dpm/ μl	
Kontrolle	$360 \pm 17 \%$	$313 \pm 11 \%$	n = 8
5 h	$514 \pm 20 \%$	$344 \pm 8 \%$	n = 9

3.3.2.2. Fruchtwasser

Für das Fruchtwasser gilt hinsichtlich der ^{14}C -Aktivität dasselbe wie für das Serum.

	^{14}C dpm/ μl	^{32}P dpm/ μl	
Kontrolle	$185 \pm 22 \%$	$462 \pm 16 \%$	n = 8
5 h	$267 \pm 22 \%$	$506 \pm 20 \%$	n = 9

Zur Aktivitätsmessung wurde der säurelösliche Teil des Fruchtwassers eingesetzt.

3.3.2.3. Laugen-Säuren-Fraktionierung

Für den Einbau der ^{14}C -Glucose-Fragmente liegen die Werte in allen Fraktionen bis doppelt so hoch wie die der Kontrollen, außer bei DNA, wo er auf 80 % der Kontrolle gesunken ist. Die ^{32}P -Aktivität hält sich im wesentlichen im Bereich der Kontrollen, nur daß auch hier der DNA-Wert erheblich vermindert ist (27 % der Kontrolle).

Nach diesem Vorversuch ist jedoch nicht auszuschliessen, daß auch der Einbau von ^{14}C -Bruchstücken in die RNA unter dem Einfluß von ARA-C beeinträchtigt ist.

Während nämlich die Einbauraten in die säurelösliche Fraktion, Lipide, Glycosaminoglycane und Proteine etwa 200 % der Kontrollen (100 %) betragen, wird in der RNA-Fraktion nur ein Wert von 160 % gemessen.

Dieses äußert sich in einer veränderten Einbaurelation ^{14}C in Lipiden / ^{14}C in RNA sowie ^{14}C in RNA / ^{32}P in RNA. Deshalb lohnt sich eine genauere Analyse des RNA-Stoffwechsels unter dem Einfluß von ARA-C.

3.3.3. Hauptversuch

Die Bestimmung der spez. Akt. in den Basen und Nucleotiden wird ebenfalls nach einer 5-stündigen Einwirkung von 100 mg ARA-C/kg durchgeführt. Das ARA-C ist in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

3.3.3.1. Nucleotide

Bei den Nucleotiden beträgt die spez. Akt. der Phosphat-Gruppe durchweg nur noch 70 % der Kontrollen (Tab. 21). Für ^{14}C ist die spez. Akt. jedoch allgemein um 20 - 30 % erhöht. Nur CMP bleibt fast unverändert.

3.3.3.2. Basen

Unter dem Einfluß des ARA-C verändern sich auch die spez. Akt. in den Basen (Tab. 22). Sie ist - wie auch bei den Nucleotiden - bei den Basen, die aus der ribosomalen RNA isoliert wurden, erhöht. Die Basen der transfer RNA befinden sich auf dem Aktivitätsniveau der Kontrollgruppe.

3.3.4. Zusammenfassung

Für die ^{14}C -Aktivität liegt das Niveau in der Versuchsgruppe doppelt so hoch wie in der Kontrolle. Dementsprechend sind die Lipid-, Glycosaminoglycan- und Proteinfraktion auch doppelt so hoch markiert. Bei RNA macht sich eine leichte Hemmung bemerkbar und schließlich

^{14}C				^{32}P			
Kontrolle dpm/nmol		5 h dpm/nmol	% d. Kontrolle	Kontrolle dpm/nmol		5 h dpm/nmol	% d. Kontrolle
ribosomal							
CMP	10,4	10,7	103 %	12,8	9,0	70 %	
UMP	14,9	19,5	131 %	13,9	9,8	70 %	
GMP	15,0	18,9	126 %	12,6	8,8	70 %	
AMP	11,6	13,2	114 %	14,7	10,2	69 %	
transfer							
CMP	12,3	13,5	109 %	18,2	12,2	67 %	
UMP	17,1	22,5	131 %	17,7	13,1	74 %	
GMP	16,3	21,5	132 %	16,2	11,9	73 %	
AMP	13,0	16,0	123 %	17,8	13,1	74 %	

Tabelle 21:

Spezifische Aktivität der Nucleotide, die nach Gradientenzentrifugation aus ribosomaler und transfer RNA am Tag 12 isoliert wurden. Versuchsbedingungen wie in der Legende der Tabelle 20. Die Streuung der Werte beträgt $\pm 5\%$.

		Kontrolle dmp/nmol	5 h dpm/ nmol	% der Kontrolle
ribosomal	G	1,3 $\pm$ 11 %	2,2 $\pm$ 10 %	170 %
	A	1,3 $\pm$ 15 %	1,8 $\pm$ 10 %	140 %
	C	1,1 $\pm$ 3 %	1,8 $\pm$ 15 %	160 %
	U	3,4 $\pm$ 14 %	6,4 $\pm$ 11 %	190 %
transfer	G	2,1 $\pm$ 9 %	2,0 $\pm$ 15 %	95 %
	A	1,9 $\pm$ 10 %	1,8 $\pm$ 8 %	95 %
	C	2,0 $\pm$ 11 %	1,7 $\pm$ 13 %	85 %
	U	6,0 $\pm$ 14 %	6,3 $\pm$ 12 %	105 %

Tabelle 22:

Spezifische Aktivität der Basen, die nach Gradientenzentrifugation aus ribosomaler und transfer RNA am Tag 12 isoliert wurden. Versuchsbedingungen wie in der Legende der Tabelle 20.

ist sie bei DNA mit 68 % ganz ausgeprägt. Wie aus den Arbeiten von BOCHERT und von RITTER et al. hervorgeht, wird die DNA-Synthese eindeutig gehemmt. In diesem Sinne macht sich auch die Veränderung des Verhältnisses von $\mu\text{g RNA} / \mu\text{g DNA}$ bemerkbar. Das Verhältnis ändert sich zugunsten der RNA-Menge.

Die ^{14}C -Aktivität aller Nucleotide außer Cytosin-Monophosphat ist eindeutig angestiegen, und die ^{32}P -Aktivität ist bei allen Nucleotiden auf etwa 70 % gesunken.

Bei den Nucleotiden sind zwischen denen der ribosomalen und transfer RNA keine besonderen Unterschiede zu sehen, wohl aber bei den Basen. Die spez. Akt. der ribosomalen Basen ist erheblich stärker gestiegen als die der Nucleotide, während die transfer Basen unter der Einwirkung des ARA-C keine Änderung in der spez. Akt. erfuhren. Die transfer Basen und Nucleotide sind durchweg höher markiert als die ribosomalen.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß ARA-C im embryonalen Gewebe auch zu klar demonstrierenden Effekten im RNA-Stoffwechsel führt. Dies äußert sich in einer Dissoziation der Einbauraten in die verschiedenen RNA-Bausteine und in einer unterschiedlichen Beeinflussung der Einbaurate in r-RNA bzw. t-RNA. Es ist z.Zt. schwer abzuschätzen, ob diesen Stoffwechselstörungen eine Bedeutung beim Zustandekommen der embryotoxischen Wirkung zukommt - neben dem Effekt von ARA-C auf den DNA-Stoffwechsel.

4. Ausblick

=====

Die Versuche zeigen unter dem Einfluß von Pharmaka Hemmungen oder Erhöhungen der spez. Akt. in den Nucleinsäurebausteinen. Diese Befunde stimmen teilweise mit Ergebnissen von in-vitro-Versuchen überein und sind auf Hemmung oder Stimulierung von Enzymen zurückzuführen.

Erhöhung oder Erniedrigung der spez. Akt. in der RNA muß eine entsprechende Änderung im Pool der Triphosphate - die die unmittelbaren Präkursoren der RNA sind - als Ursache haben. Wahrscheinlich ist eine Änderung der spez. Akt. der Pools mit einer Änderung der Gesamtmenge überhaupt verbunden. Als nächster Schritt ist deshalb geplant, die Triphosphate zu isolieren.

A N H A N G
=====

	Mol. - Gew.	λ max pH 1 nm	ϵ max pH 1 $\times 10^3$	$\frac{250}{260}$	$\frac{280}{260}$	$\frac{290}{260}$	$\frac{250}{260}$	$\frac{290}{260}$	$\frac{290}{260}$
ADENIN	135,13	260 ^{*1}	13,2 ^{**}	0.76 + 0.02	0.38 + 0.02	0.04 + 0.01	0.80 + 0.03	0.37 + 0.02	0.06 + 0.02
GUANIN	151,13	250 ^{*2}	11,4	1.37 + 0.03	0.84 + 0.02	0.48 + 0.02	1.35 + 0.02	0.78 + 0.04	0.46 + 0.03
CYTOSIN	111,10	275	10,0	0.48 + 0.02	1.50 + 0.03	0.77 + 0.02	0.51 + 0.03	1.43 + 0.05	0.72 + 0.03
URACIL	112,09	260 ⁺	8,2	0.83 + 0.02	0.20 + 0.02	< 0.02	0.83 + 0.02	0.26 + 0.02	0.06 + 0.02
AMP (2',3')	347,23	257	15,0	0.85 --	0.22 --	0.04	0.86 + 0.02	0.23 + 0.02	0.05 + 0.02
GMP (2',3')	363,23	257	12,5	0.93 --	0.68 --	0.48	0.91 + 0.01	0.68 + 0.01	0.48 + 0.01
GMP (2',3')	323,20	280 ^{*3}	13,2	0.47 + 0.04	1.91 + 0.07	1.32 + 0.05	0.46 + 0.02	1.88 + 0.04	1.30 + 0.03
UMP (2',3')	324,18 ⁺⁺	260 ^{*1}	9,9 ⁺⁺	0.76 + 0.02	0.33 + 0.03	< 0.03	0.80 + 0.02	0.30 + 0.02	0.05 + 0.01

Die Werte sind entnommen aus BIOCHEMICA (MERCK) 1970/71.

Für die Elutionsmethode für die eigenen Werte siehe Text.

* Es wurden einige Ungenauigkeiten in Kauf genommen, sofern Messungen eingespart werden konnten und die Abweichung unter $\pm 1\%$ blieb.

- 1) 260 nm statt 262 nm
- 2) 250 " " 248 "
- 3) 280 " " 279 "

** Mittel d. ϵ max bei p_H^1 λ max 262 nm und p_H^7 λ max 260 nm

⁺ p_H^1 statt p_H^2

⁺⁺ aus Tafel von Calbiochem (Okt. 1964)

Literaturwerte		Eigene Werte

MUSTER

umol
↓
pro umol
↓

NO.	FL.E.TOT.	TRAPEZ			./FL.E.	DIV.	FL./QUANT.	VERH.
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	
1	G 390	5.10	0.62	315.44	2.23	141.45	1.0000	
2	A 1397	7.40	1.03	1217.27	4.04	301.30	2.1300	
3	C 444	5.27	1.43	266.29	2.33	114.29	.8079	
4	U 1010	7.21	2.25	627.47	3.90	160.89	1.1374	
5	194	5.33	0.29	157.55	1.15	137.00	1.0000	
6	723	7.35	0.63	613.81	2.02	303.86	2.2179	
7	242	5.09	0.94	129.17	1.17	110.40	.8058	
8	524	5.86	1.61	301.53	1.95	154.63	1.1286	
9	450	6.64	0.70	340.40	2.23	152.64	1.0000	
10	1362	6.87	1.16	1174.08	4.04	290.61	1.9038	
11	439	4.96	1.55	257.71	2.33	110.60	.7246	
12	1030	8.07	2.26	599.94	3.90	153.83	1.0077	
13	219	4.14	0.61	159.45	1.15	138.65	1.0000	
14	790	7.00	1.06	615.03	2.02	304.47	2.1959	
15	290	4.99	1.45	119.38	1.17	102.04	.7359	
16	650	6.45	2.21	313.87	1.95	160.96	1.1609	

17

	M	S %	REL.F. %
F C _T	142.4384	4.94	2.4742
V	1.0000	.00	0.0000
F A	300.0654	2.14	1.0744
	2.1119	6.80	3.4014
F C ₁	109.3372	4.73	2.3696
V	.7686	5.79	2.8956
F U	157.5794	2.46	1.2309
V	1.1086	6.19	3.0957

Die Werte "a", "b", "c" und "e" werden in die Rechenmaschine (Wang 370) eingegeben. "a" ist die gesamte Kurvenfläche (siehe 2.4.6.), "b" die Länge des Trapezes, "c" seine mittlere Höhe und "e" ein Divisor nach den jeweiligen Erfordernissen des Versuches.

"d" gibt die Kurvenfläche nach Abzug des Trapezes an und wird durch "e" geteilt. Der Quotient "f" stellt Flächeneinheiten, z.B. pro μl aufgetragener Lösung oder pro nmol, dar.

Die vier Basen - Guanin, Adenin, Cytosin, Uracil - werden in gleichbleibender Reihenfolge eingegeben. Die Fläche "f" der jeweils zuerst eingegebenen Base dient den anderen als Bezug und wird gleich 1 gesetzt ("g").

Für jede Base druckt das Gerät - in der Reihenfolge der Eingabe der Basen - Mittelwerte, ihre prozentuale Streuung und den relativen Fehler für die Flächen ("F") und die Verhältnisse ("V") aus.

MODEL

PROGRAM

TITLE: BASEN-FLÄCHEN KORREKTURNO. A(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

1) verify program

2341

5599

9103

12292

13988

2) prime

3) continue

(überschritt)

4) Fläche (gesamt)

continue

5) Trapez (Länge)
cont.6) Trapez (Höhe)
cont.7) Division
cont.

→ ad 4)

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Mark	07		40	Wr 2	25	
01	1	61		41	P	20	
02	Wr 1	24		42	Wr 2	25	
03	CRIF	71		43	E	05	
04	Wr 1	24		44	Wr 2	25	
05	printm	72		45	Z	32	
06	Wr 2	25		46	Wr 1	24	
07	N	16		47	space 4	62	
08	Wr 2	25		48	Wr 2	25	
09	0	17		49	.	56	
10	Wr 2	25		50	Wr 2	25	
11	.	56		51		57	
12	Wr 2	25		52	Wr 2	25	
13		40		53		56	
14	Wr 2	25		54	Wr 2	25	
15	F	06		55	F	06	
16	Wr 2	25		56	Wr 2	25	
17	L	14		57	L	14	
18	Wr 2	25		58	Wr 2	25	
19	.	56		59	.	56	
20	Wr 2	25		60	Wr 2	25	
21	E	05		61	E	05	
22	Wr 2	25		62	Wr 2	25	
23	.	56		63	.	56	
24	Wr 2	25		64	Wr 1	24	
25	T	24		65	space 4	62	
26	Wr 2	25		66	Wr 2	25	
27	0	17		67	D	04	
28	Wr 2	25		68	Wr 2	25	
29	T	24		69	1	11	
30	Wr 2	25		70	Wr 2	25	
31	.	56		71	V	26	
32	Wr 1	24		72	Wr 2	25	
33	space 4	62		73	.	56	
34	Wr 2	25		74	Wr 1	24	
35	T	24		75	space 2	61	
36	Wr 2	25		76	Wr 2	25	
37	R	22		77	F	06	
38	Wr 2	25		78	Wr 2	25	
39	A	01		79	L	14	



WANG

LABORATORIES, INC.

CARD / SHEET NO.

836 NORTH STREET, TEWKSBURY, MASSACHUSETTS 01876

MODEL

PROGRAM

TITLE: BASEN - FLÄCHENKORREKTUR NO. B

(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	wr 2	25		40	0	60	
01	.	56		41	St. Dr.	26	
02	wr 2	25		42		74	
03	/	57		43	0	60	
04	wr 2	25		44	St. Dr.	26	
05	Q	21		45		67	$\Sigma (FLG)^2$
06	wr 2	25		46	0	60	
07	U	25		47	St. Dr.	26	
08	wr 2	25		48		66	
09	A	01		49	0	60	
10	wr 2	25		50	St. Dr.	26	
11	N	16		51		65	
12	wr 2	25		52	0	60	
13	T	24		53	St. Dr.	26	
14	wr 2	25		54		64	
15	.	56		55	0	60	
16	wr 1	24		56	St. Dr.	26	
17	pace 2	61		57		57	
18	wr 2	25		58	0	60	
19	V	26		59	St. Dr.	26	
20	wr 2	25		60		56	
21	E	05		61	0	60	
22	wr 2	25		62	St. Dr.	26	
23	R	22		63		55	
24	wr 2	25		64	0	60	
25	H	10		65	St. Dr.	26	
26	wr 2	25		66		54	
27	.	56		67	0	60	
28	0	60		68	St. Dr.	26	
29	St. Dr.	26		69		47	
30		36	N	70	0	60	
31	0	60		71	St. Dr.	26	
32	St. Dr.	26		72		46	
33		77	ΣFLG	73	0	60	
34	0	60		74	St. Dr.	26	
35	St. Dr.	26		75		45	
36		76		76	0	60	
37	0	60		77	St. Dr.	26	
38	St. Dr.	26		78		44	
39		75		79	Man 2	07	

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

MODEL

PROGRAM

TITLE: BASEN - FLÄCHENKORREKTUR NO. C

(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	2	62		40	+AR	52	
01	wr 1	24		41	St. Div	26	
02	LF	70		42		76	
03	near rel	03	GUANIN	43	Rec 3	17	
04	3	63		44	x2	45	
05	St. Div	26		45	+AL	56	
06		33		46	Rec Div	27	
07	Rec Div	27		47		66	
08		77		48	+AL	56	
09	+AR	52		49	AL	54	
10	St. Div	26		50	St. Div	26	
11		77		51		66	
12	Rec 3	17		52	near rel	03	
13	x2	45		53	+	64	
14	+AL	56		54	Rec Div	27	
15	Rec Div	27		55		56	
16		67		56	+AL	56	
17	+AL	56		57	St. Div	26	
18	AL	54		58		56	
19	St. Div	26		59	near rel	03	
20		67		60	5	65	
21	near rel	03		61	Rec Div	27	
22	+	64		62		46	
23	Rec Div	27		63	+AL	56	
24		57		64	AL	54	
25	+AL	56		65	St. Div	26	
26	St. Div	26		66		46	
27		57		67	near rel	03	CYTOSIN
28	near rel	03		68	3	63	
29	5	65		69	Rec Div	27	
30	Rec Div	27		70		75	
31		47		71	+AR	52	
32	+AL	56		72	St. Div	26	
33	AL	54		73		75	
34	St. Div	26		74	Rec 3	17	
35		47		75	x2	45	
36	near rel	03	ADENIN	76	+AL	56	
37	3	63		77	Rec Div	27	
38	Rec Div	27		78		65	
39		76		79	+AL	56	

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

MODEL

PROGRAM

TITLE: BASEN-FLÄCHEN AUSWERTUNG NO. 1)

(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	QAL	54		40		54	
01	St Div	26		41	near rel	03	
02		65		42	5	65	
03	near rel	03		43	Rec Div	27	
04	4	64		44		44	
05	Rec Div	27		45	+AL	56	
06		55		46	QAL	54	
07	+AL	56		47	St Div	26	
08	St Div	26		48		44	
09		55		49	near rel	02	
10	near rel	03		50	2	62	
11	5	65		51	Maiz	07	Maizes
12	Rec Div	27		52	3	63	
13		45		53	W1	24	
14	+AL	56		54	CRILF	71	
15	QAL	54		55	Rec Div	27	
16	St Div	26		56		36	
17		45		57	+AL	56	
18	near rel	03	URACIL	58	1	61	
19	3	63		59	+AL	56	
20	Rec Div	27		60	St Div	26	
21		74		61		36	
22	+AL	52		62	W1	24	No.
23	St Div	26		63	DP	10	
24		74		64	QAL	54	
25	Rec 3	17		65	QAL	76	
26	x2	45		66	stop	01	FL.E TOT
27	+AL	56		67	stop if 0	30	
28	Rec Div	27		68	near rel	02	
29		64		69	6	66	
30	+AL	56		70	stop	01	
31	QAL	54		71	Maiz	07	
32	St Div	26		72	6	66	
33		64		73	+AL	56	
34	near rel	03		74	W1	24	
35	4	64		75	DP	40	
36	Rec Div	27		76	QAL	76	
37		54		77	stop	01	TRAP HITE
38	+AL	56		78	W1	24	
39	St Div	26		79	DP	21	

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

WANG

LABORATORIES, INC.

836 NORTH STREET NEWBURY, MASSACHUSETTS 01766

CARD / SHEET NO.

MODEL

PROGRAM

TITLE: BASEN- FLÄCHENKORREKTURNO. E(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	entr	41		40	Mar2	07	
01	stop	01	TRAPEZ (#)	41	S	65	
02	Wsr1	24		42	Rec 2	16	
03	.DP	11		43	CLAL	54	
04	x =	46		44	x ²	45	
05	entr	41		45	+AL	56	
06	2	62		46	return	04	
07	3	63		47			
08	5	75		48			
09	S	65		49			
10	R	70		50			
11	x =	46		51			
12	changes	77		52			
13	+AL	56		53			
14	Wsr1	24	A FL. E.	54			
15	.DP	31		55			
16	CLAL	54		56			
17	entr	41		57			
18	stop	01	Div.	58			
19	Wsr1	24		59			
20	.DP	21		60			
21	÷	47		61			
22	Wsr1	24		62			
23	.DP	31		63			
24	St 3	13		64			
25	+AR	52		65			
26	return	04		66			
27	Mar2	07		67			
28	+	64		68			
29	Rec 3	17		69			
30	CLAR	50		70			
31	entr	41		71			
32	Rec 1/2	27		72			
33		33	FL G	73			
34	÷	47		74			
35	+AL	56		75			
36	St 2	12		76			
37	Wsr1	24	VERHÄLTNIS	77			
38	.DP	22		78			
39	return	04		79			

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

WANG

LABORATORIES, INC.

CARD / SHEET NO.

836 NORTH STREET, TEWKSBURY, MASSACHUSETTS 01876

MODEL

PROGRAM

TITLE: BASEN (FEHLERRECHNUNG)

NO. F

(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS AND NOTES)

- 1) prime
2) verify program

2881
5216
7614
10225
10532

- 3) prime
4) continue
(Überschrift + Ergebnisse)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	MARK	07		40	wr2	25	
01	1	1		41		46	
02	wr1	24		42	wr2	25	
03	CRILF	71		43	%	45	
04	wr1	24		44	wr1	24	
05	space	65		45	print off	73	
06	wr1	24		46	1	61	
07	print on	72		47	-A _L	57	
08	wr2	25		48	Rec Div	27	
09	M	15		49		36	
10	wr1	24		50	+A _L	56	
11	print off	73		51	ender	41	
12	wr1	24		52	4	64	
13	space	67		53	=	47	
14	wr1	24		54	St. Div	26	N KORREKTUR
15	print on	72		55		36	
16	wr2	25		56	QAL	54	
17	S	23		57	wr1	24	
18	wr2	25		58	LF	70	
19		40		59	wr1	24	
20	wr2	25		60	CRILF	71	
21	%	45		61	wr1	24	
22	wr1	24		62	print on	72	
23	print off	73		63	wr2	25	
24	wr1	24		64	F	06	
25	space	64		65	wr1	24	
26	wr1	24		66	print off	73	
27	print on	72		67	Rec Div	27	
28	wr2	25		68		77	
29	R	22		69	rec ret	03	
30	wr2	25		70		02	
31	E	05		71	Rec Div	27	
32	wr2	25		72		77	
33	L	14		73	rec ret	03	
34	wr2	25		74		03	
35	.	56		75	Rec Div	27	
36	wr2	25		76		67	
37	F	06		77	rec ret	03	
38	wr2	25		78		04	
39	.	56		79	St Div	26	

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM CODES)



WANG

LABORATORIES, INC.

836 NORTH STREET, TEWKSBURY, MASSACHUSETTS 01876

CARD / SHEET NO

MODEL

PROGRAM

TITLE: BASEN (FEHLERRECHNUNG)

NO. G

(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00		34		40		02	
01	rea rel	03		41	Rec Dir	27	
02		05		42		76	
03	Wsr 1	24		43	rea rel	03	
04	CR/LF	71		44		03	
05	Wsr 1	24		45	Rec Dir	27	
06	print on	72		46		66	
07	Wsr 2	25		47	rea rel	03	
08	V	26		48		04	
09	Wsr 1	24		49	St Dir	26	
10	print off	73		50		34	
11	Rec Dir	27		51	rea rel	03	
12		57		52		05	
13	rea rel	03		53	Wsr 1	24	
14		02		54	CR/LF	71	
15	Rec Dir	27		55	Wsr 2	24	
16		57		56	print on	72	
17	rea rel	03		57	Wsr 2	25	
18		03		58	V	26	
19	Rec Dir	27		59	Wsr 1	24	
20		47		60	print off	73	
21	rea rel	03		61	Rec Dir	27	
22		04		62		56	
23	St Dir	26		63	rea rel	03	
24		34		64		02	
25	rea rel	03		65	Rec Dir	27	
26		05		66		56	
27	Wsr 1	24		67	rea rel	03	
28	LF	70		68		03	
29	Wsr 1	24	4-DIGIT IN	69	Rec Dir	27	
30	CR/LF	71		70		46	
31	Wsr 1	24		71	rea rel	03	
32	print on	72		72		04	
33	Wsr 2	25		73	St Dir	26	
34	F	06		74		34	
35	Wsr 1	24		75	rea rel	03	
36	print off	73		76		05	
37	Rec Dir	27		77	Wsr 1	24	
38		76		78	LF	70	
39	rea rel	03		79	Wsr 1	24	

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

WANG

LABORATORIES, INC

CARD / SHEET NO.

836 NORTH STREET, TEWKSBURY, MASSACHUSETTS 01876

MODEL

PROGRAM

TITLE: BASEN (FEHLERRECHNUNG)

NO. H

(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	CRILF	71	CYTOSIN	40		45	
01	wcr1	24		41	rea rel	03	
02	print on	72		42		04	
03	wcr2	25		43	st dir	26	
04	F	06		44		34	
05	wcr1	24		45	rea rel	03	
06	print off	73		46		05	
07	Rec Dir	27		47	wcr1	24	
08		75		48	LF	70	
09	rea rel	03		49	wcr1	24	URACIL
10		02		50	CRILF	71	
11	Rec Dir	27		51	wcr1	24	
12		75		52	print on	72	
13	rea rel	03		53	wcr2	25	
14		03		54	F	06	
15	Rec Dir	27		55	wcr1	24	
16		65		56	print off	73	
17	rea rel	03		57	Rec Dir	27	
18		04		58		74	
19	st dir	26		59	rea rel	03	
20		34		60		02	
21	rea rel	03		61	Rec Dir	27	
22		05		62		74	
23	wcr1	24		63	rea rel	03	
24	CRILF	71		64		03	
25	wcr1	24		65	Rec Dir	27	
26	print on	72		66		64	
27	wcr2	25		67	rea rel	03	
28	V	26		68		04	
29	wcr1	24		69	st dir	26	
30	print off	73		70		34	
31	Rec Dir	27		71	rea rel	03	
32		55		72		05	
33	rea rel	03		73	wcr1	24	
34		02		74	CRILF	71	
35	Rec Dir	27		75	wcr1	24	
36		55		76	print on	72	
37	rea rel	03		77	wcr2	25	
38		03		78	V	26	
39	Rec Dir	27		79	wcr1	24	

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

CARD / SHEET NO.

MODEL

PROGRAM

TITLE: BASEN (FEHLERRECHNUNG)

NO. I

(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	print off	73		40	4	04	
01	Rec Dir	27		41	+AR	56	
02		54		42	CE AR	54	
03	rec rel	03		43	enter	41	
04		02		44	Rec Dir	27	
05	Rec Dir	27		45		36	
06		54		46	CE AR	50	
07	rec rel	03		47	+AR	52	
08		03		48	1	61	
09	Rec Dir	27		49	-AR	53	
10		44		50	÷	47	
11	rec rel	03		51	Γ	44	STREUUNG
12		04		52	return	04	
13	St Dir	26		53	MARK	07	
14		34		54	5	05	
15	rec rel	03		55	enter	41	
16		05		56	1	61	
17	stop	01		57	0	60	
18	MARK	07		58	0	60	
19	2	02		59	x=	46	
20	enter	41		60	enter	41	
21	Rec Dir	27		61	Rec Dir	27	
22		36		62		37	
23	÷	47		63	÷	47	
24	wr1	24	HITTEL	64	wr1	24	
25	DP	52		65	DP	51	
26	St Dir	26		66	Rec Dir	27	
27		57		67		36	
28	return	04		68	Γ	44	
29	MARK	07		69	CE AR	50	
30	3	03		70	+AR	52	
31	x ²	45		71	Rec Dir	27	
32	enter	41		72		34	
33	Rec Dir	27		73	enter	41	
34		36		74	Rec Dir	51	
35	÷	47		75	÷	47	
36	changes	77		76	enter	41	
37	+AR	56		77	Rec Dir	27	
38	return	04		78		37	
39	MARK	07		79	=	47	

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

MODEL

PROGRAM

TITLE: BASEN (FEHLERRECHNUNG)

NO.

7

(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	enter	41		40			
01	1	61		41			
02	0	60		42			
03	0	60		43			
04	x=	46		44			
05	ws 1	24		45			
06	DP	52		46			
07	return	04		47			
08				48			
09				49			
10				50			
11				51			
12				52			
13				53			
14				54			
15				55			
16				56			
17				57			
18				58			
19				59			
20				60			
21				61			
22				62			
23				63			
24				64			
25				65			
26				66			
27				67			
28				68			
29				69			
30				70			
31				71			
32				72			
33				73			
34				74			
35				75			
36				76			
37				77			
38				78			
39				79			

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

CARD / SHEET NO



WANG

LABORATORIES, INC.

836 NORTH STREET NEWKSB. BY MASSACHUSETTS 01870

M U S T E R
=====

VERSUCH:

TEIL:

LFID.NR.	DPM/ML 14 -C	DPM/ML 32 -P
1	1577	1975
2	1982	2469
3	2184	2716
4	1658	2345

Das Doppelmarkierungsprogramm korrigiert die Zählergebnisse des ^{14}C -Kanals (Eliminierung des ^{32}P -Anteils, Zählausbeute, Leerwert) und des ^{32}P -Kanals (Zerfall-Faktor, Zählausbeute, Leerwert). Neben den Zählergebnissen des liquid-scintillation-counters müssen Leerwerte, Zählausbeuten, der ^{32}P -Anteil im ^{14}C -Kanal (die letzten beiden hängen von der ratio ab; siehe Abb. 8) und Zerfall-Faktor eingegeben werden. Außerdem kann das Ergebnis um einen beliebigen Faktor - der auch eingegeben werden muß - korrigiert werden (z.B. für die Umrechnung auf ein anderes Volumen). Das Gerät druckt für ^{14}C und ^{32}P getrennt dpm/Volumen aus (Muster).

MODEL

PROGRAM

TITLE: DOPPELMARKIERUNG

NO. 1

(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Marz	07		40	wr2	25	
01	1	01		41	F	06	
02	wr1	24		42		25	
03	CRILF	71		43	D	04	
04	wr1	24		44		25	
05	print	72		45	.	56	
06	wr2	25		46		25	
07	Y	26		47	N	16	
08		25		48		25	
09	E	05		49	R	22	
10		25		50		25	
11	R	22		51	.	56	
12		25		52	wr1	24	
13	S	23		53	space 4	62	
14		25		54	wr2	25	
15	u	25		55	D	04	
16		25		56		25	
17	C	03		57	P	20	
18		25		58		25	
19	H	10		59	M	15	
20		25		60		25	
21	:	72		61	/	57	
22	wr1	24		62		25	
23	space 14	67		63	M	15	
24	wr2	25		64		25	
25	T	24		65	L	14	
26		25		66	wr2	25	
27	E	05		67		40	
28		25		68	wr1	24	
29	I	11		69	print off	73	
30		25		70	1	61	
31	L	14		71	4	64	
32		25		72	wr1	24	
33	.	72		73	DP	10	
34	wr1	24		74	6 in	76	
35	LF	70		75	wr1	24	
36	wr1	24		76	print	72	
37	CRILF	71		77	wr2	25	
38	wr2	25		78	-	55	
39	L	14		79	wr2	25	

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

WANG

LABORATORIES, INC.

CARD / SHEET NO.
836 NORTH STREET, TEWKSBURY MASSACHUSETTS 01876

MODEL

PROGRAM

TITLE: DOPPELMARKIERUNGNO. 2(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

alle Werte
wurden als
Multiplikanden
eingetragen.

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	C	03		40	12	12	
01	wr1	24		41	Q Dr	76	
02	space	62		42	stop	01	EINGABE 8
03	wr2	25		43	St Dr	26	
04	D	04		44	13	13	
05		25		45	(Q) Dr	76	
06	P	20		46	2ea rel	03	
07		25		47	3	03	
08	M	15		48	Mark	07	
09		25		49	3	03	
10	/	57		50	wr1	24	
11		25		51	CRIF	71	
12	M	15		52	stop	01	EINGABE 1
13		25		53	wr1	24	
14	L	14		54	DP	20	
15	wr2	25		55	Rec 0	14	
16		40		56	stop	01	EINGABE 2
17	wr1	24		57	St 0	10	
18	print	73		58	Rec 1	15	
19	5	63		59	stop	01	EINGABE 3
20	2	62		60	St 1	11	
21	wr1	24		61	Rec 2	16	
22	DP	10		62	stop	01	EINGABE 4
23	wr1	24		63	St 2	12	
24	print	72		64	Rec 3	17	
25	wr2	25		65	stop	01	EINGABE 5
26	—	55		66	St 3	13	
27	wr2	25		67	Q Dr	76	
28	P	20		68	stop	01	EINGABE 9
29	(Q) Dr	76		69	St Dr	26	
30	wr1	24		70	14	14	
31	print	73		71	+AR	52	
32	Mark	07		72	Q Dr	76	
33	2	02		73	stop	01	EINGABE 10
34	stop	01	EINGABE 6	74	St Dr	26	
35	St Dr	26		75	15	15	
36	11	11		76	entv	41	
37	(Q) Dr	76		77	Rec 2	16	
38	stop	01	EINGABE 7	78	X	46	
39	St Dr	26		79	entv	41	

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

MODEL

PROGRAM

TITLE: DOPPELHARKIERUNGNO. 3(THIS SPACE FOR INSTRUCTIONS
AND NOTES)

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	1	61		40	Rec 1	15	
01	0	60		41	÷	47	
02	0	60		42	entr	41	
03	÷	47		43	1	61	
04	-AR	53		44	0	60	
05	Rec Dir	27		45	0	60	
06	12	12		46	x	46	
07	-AR	53		47	entr	41	
08	QAR	50		48	Rec 3	17	
09	entr	41		49	÷	47	
10	1	61		50	entr	41	
11	0	60		51	Rec Dir	27	
12	0	60		52	11	11	
13	x	46		53	x	46	
14	entr	41		54	ws 1	24	
15	Rec 0	14		55	space 2	66	
16	÷	47		56	ws 1	24	
17	entr	41		57	DP	20	
18	Rec Dir	27		58	Q Dir	76	
19	11	11		59	return	04	
20	x	46		60			
21	ws 1	24	dpul/ml 14c	61			
22	space 6	63		62			
23	ws 1	24		63			
24	DP	30		64			
25	Harz	07		65			
26	5	05		66			
27	Rec Dir	27		67			
28	15	15		68			
29	+AR	52		69			
30	Rec Dir	27		70			
31	13	13		71			
32	-AR	53		72			
33	QAR	50		73			
34	entr	41		74			
35	1	61		75			
36	0	60		76			
37	0	60		77			
38	x	46		78			
39	entr	46		79			

(SEE OTHER SIDE FOR PROGRAM
CODES)

WANG

LABORATORIES, INC.

CARD / SHEET NO

876 N. BETH STREET, NEWTON, MASSACHUSETTS 02459

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- BERNFELD, P., J.S. NISSELBAUM, B.J. BERKEEY, R.W. HANSON :
The Influence of Chemical and Physiochemical
Nature of Macromolar Polyanions on their Inter-
action with Human Serum β -Lipoproteins
in: J.B.C. 235, IV, 1960, p. 2852
- BIEBER, S., L.S. DIETRICH, G.B. ELION : The incorporation of
6-mercaptopurine- ^{35}S into the nucleic acid of
sensitive and nonsensitive transportable mouse
tumor
in: Cancer Res. 21, 1961, p. 228 ff
- BOCHERT, G. (a) Eine Analyse der DNA-Synthese im embryonalen
Säugetiergewebe unter dem Einfluß einiger embryo-
toxischer Pharmaka
in: Inaugural-Dissertation Freie Universität Berlin
- BOCHERT, G. (b), R. KROWKE, P. MEWES : "Methode" in Vorbereitung
in: Naunyn-Schmied. Arch. Pharmak. 1972
- BOCK, R. M. : Alkaline Hydrolysis of RNA
in: Meth. in Enz. Vol. XII A, 1967, p. 225
- BRAUN, W., G. KORTUM : Quantitative Auswertung von Papierchromato-
grammen durch Reflexionsmessungen
in: ZEISS-Informationen 67, 1968, p. 27 - 29
- BRIDGER, RELPH : in: Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatogra-
phy, ed. by E.J. Shellard, Academic Press, London +
New York 1968
- BURTON, K. : A study of the conditions and mechanisms of the
reaction for the colorimetric estimation of
deoxyribonucleic acid
in: Biochem. J. 62, 1956, p. 315 - 323
- BUSH, I.E. : Chromatography of the Steroids
in: Pergamon Press, London 1961
- CARDEILHAC, P.T., S.S. COHEN : Some metabolic properties of nucleo-
tides of 1- β -D-arabinofuranoxylcytosin
- CHU, M.Y., G.A. FISCHER : The incorporation of ^3H -cytosin arabino-
side and its effect on murine leukemic cells
in: Biochem. Pharmacol. 17, 1968, p. 753 ff

- CLICK, R.E. : Elektrophoretic separation of the mononucleotides from an alkaline hydrolysate of RNA
in: BBA 129, 1966, p. 424 - 426
- CLICK, R.E., D. P. HACKETT : The isolation of Ribonucleic Acid from plant, bacterial or animal cells
in: BBA 129, 1966, p. 74 - 84
- COHEN, S.S. : Introduction to the biochemistry of D-arabino-syl nucleotides
in: Progr. in Nucl. Acid Res. molec. Biol. 5, 1966, 1
- COHN, W. E. : "The Separation of Purine and Pyrimidine Bases and of Nucleotides by Ion Exchange"
in: Science 109, 1949, p. 377
- DAVIDSON, J. N., R.M.S. SMELLIE : Phosphorus Compounds in the Cell; The Separation by Ionophoresis on Paper of the Constituent Nucleotides of Ribonucleic Acids.
in: Biochem. J. 52, 1952, p. 594 ff
- EAST, J. L. : Nucleotide Composition of Ribonucleic Acid by Spectral Analysis and Thin-Layer Chromatography
in: Anal. Biochem. 24, 1968, p. 409 - 418
- EICH, E., H. GEISLER, E. MUTSCHLER, W. SCHUNACK : Die direkte quantitative Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen durch Remissions- und Fluoreszenzmessungen
in: Arzneimittelforsch. 19, 1969, p. 1895 - 1897
- ELION, G. B. : Biochemistry and pharmacology of purine analogs
in: Fed. Proc. 26, 1967, p. 898 ff
- ELION, G. B., E. BURGI, G. H. HITCHINGS : Studies on condensed pyrimidine systems. IX. The synthesis of some 6-substituted purines
in: J. Amer. chem. Soc. 74, 1952, p. 411 ff
- ELSON, D., E. CHARGAFF: Evidence of Common Regularities in the Composition of Pentose Nucleic Acids
in: BBA 17, 1955, p. 361 - 376
- FAIRBAIRN, J. W. : Factors Involved in Producing Uniform Spots
in: Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography ed. by E.J. Shellard, Academic Press London + New York 1968

- FURTH, J. J., S. S. COHEN : Inhibition of mammalian DNA polymerase by the 5'-triphosphate of 9- β -D-arabinofuranosyladenine
in: Cancer Res. 27, 1967, p. 1528 ff
- HALL, B. D., P. DOTY : The preparation and Physical Chemical Properties of RNA from Microsomal Particles
in: J.M.B. 1, 1959, p. 111 - 126
- HARRIS, M. Y., A. F. STUART, W. E. COURT : The Assay of *Rauwolfia cuminsii* by Quantitative Thin-Layer Chromatography
in: Planta med. 16, 1968, p. 217
- HITCHINGS, G.H., G. B. ELION, E. A. FALCO, H. VAN DER WERFF : Studies on analogs of purines and pyrimidines
in: Ann N.Y. Acad. Sci. 52, 1950, p. 1318 ff
- JORK, H. : Direkte spektralphotometrische Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen im UV-Bereich
in: Z. anal. Chem. 221, 1966, p. 17 - 33
- KECK, K., U. HAGEN : Trennung von DNA-Bausteinen auf Celluloseschicht
in: BBA 87, 1964, p. 685 - 687
- KIRBY, K. S. : Preparation of RNA by phenolic agents
in: Enzymology Vol. XII B, 1968, p. 87
- KLAUS, R. : Einige kritische Betrachtungen zur photometrischen Auswertung von Dünnschichtplatten
in: J. Chromat. 16, 1964, p. 311 - 326
- KLAUS, R. : Einige kritische Betrachtungen zur photometrischen Auswertung von Dünnschichtplatten
in: Pharmazeutische Zeitung 13, 1967, p. 480-485
- KNAPPSTEIN, P., J. C. TOUCHSTONE : Determination of the 2.4. Dinitrophenylhydrazones of Urine Ketosteroids by Thin-Layer Densitometry
in: J. Chromatogr. 37, 1968, p. 83 - 88
- KÖHLER, E., H.-J. EHMKE, F. WOJNOROWICZ : Growth Kinetics of Mammalian Embryos During the Stage of Differentiation. In Vorbereitung
Naunyn-Schmied. Arch. Pharmak. 1972

- KROWKE, R. : Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel in embryonalem Säugetiergewebe in-vivo und in-vitro
in: Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin 1970
- KROWKE, R. (a), G. SIEBERT, D. NEUBERT : Effect of 5-Fluoro-deoxycytidine, 5-Fluoro-uracil and Cycloheximide on the Incorporation of ^{14}C -glucose and ^{32}P into Different Cell Components of Rat Embryos in-vivo
in: Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol. 268, 1971
p. 229 - 234
- KROWKE, R. (b), K. PIELSTICKER, G. SIEBERT : A Simple Fractionation Procedure for Studying Incorporation of Radioactively labelled Precursors into Mammalian Main Cell Components
in: Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol. 271, 1971
p. 121 - 124
- KROWKE, R. (c) : Biochemical Screening Test with ^{14}C -Glucose and ^{32}P -Phosphate for the Evaluation of Embryotoxic Effects in-vivo
in: Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol. 271, 1971
p. 274 - 288
- KROWKE, R. (d), G. BOCHERT, P. MEWES : Effects of Some Metabolic Inhibitors on Nucleic Acid Synthesis in Early Stages of Mammalian Embryonic Development (Vortrag)
Joint Meeting German and Scandinavian Pharmacological Societies 1971
- KUBELKA, P., F. MUNK : Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche
in: Z. techn. Phys. 12. Jg. 1931, p. 593 - 601
- MARRIAN, D. H., K. L. SPICER, M. E. BALIS, G. B. BROWN : Purin-Incorporation into Pentose Nucleotides of the Rat.
in: J.B.C. 189, 1951, p. 533 ff
- MEYBAUM, W. : Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in ~~3,2,4,3~~ Derivaten der Adenylsäure
in: Z. physiol. Chem. 258, 1939, p. 117 ff

- MEWES, P., G. SIEBERT, D. NEUBERT : Effect of 6-Mercaptopurine on
RNA metabolism of rat embryos
in: *Teratology* 4, 1971, p. 495
- MOMPARLER, R. L. : Effect of cytosine arabinoside 5'-triphosphate
on mammalian DNA polymerase
BBRC. 34, 1969, p. 465 ff
- MURPHY, M. L. : Factors influencing teratogenic response to drug
ed. by Wilson + Warkany: *Teratology Principles and
Techniques*, Chapter 7.
The University of Chicago Press, Chicago 1965
- NEUBERT, D., OBERDISSE, E., R. BASS : Biosynthesis and Degradation
of Mammalian Mitochondrial DNA
Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria
SLATTER, TAGER, PAPA, QUAGLIARIELLO
Adriatica Editrice, Bari 1968 p. 103
- PENNER, M. H. : Thin-Layer Chromatography of Certified Coal Tar
Color Additiva
in: *J. Pharmaceut. Sci.* 57, Nr. 12, 1968
p. 2132.- 2135
- RITTER, E. J., W. J. SCOTT, G. J. WILSON : Teratogenesis and In-
hibition of DNA-Synthesis Induced in Rat Embryos
by Cytosine Arabinoside
in: *Teratology* 4, 1971, p. 4 ff
- SHELLARD, E. J. : Quantitative Thin-Layer Chromatography using
Densitometry
in: *Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography*,
ed. by E-J. SHELLARD
in: Academic Press, London and New York 1968
- SMITH, J.D., R. MARKHAM : Chromatographic studies on nucleic acids:
2. Quantitative analysis of ribonucleic acids
in: *Biochem. J.* 46, 1950, p. 509 - 513
- STAHL, E., H. JORK : Direktauswertung mit dem Chromatogramm-
Spektralphotometer
in: *ZEISS-Information* 68, 1968, p. 52 - 59

- VISCHER, E., E. CHARGAFF : The Composition of the Pentose Nucleic
Acids of Yeast and Pankreas
in: J.B.C. 176, 1948, p. 715 ff
- YOUNG, R. S. K., G. A. FISCHER : The action of arabinosylcytosine
on synchronously growing population of mammalian
cells
in: BBRC 32, 1968, p. 23 ff

Abkürzungsverzeichnis der Zeitschriften

- BBA = Biochem. Biophys. Acta
JBC = Journal Biol. Chem.
JMB = Journal Mol. Biol.
BBRC = Biochem. Biophys. Research Comm.

Peter Mewes

Lebenslauf

Geboren	am 25.4.1942 in Schönefeld (Kr. Teltow);
Schule	bis zur Mittleren Reife Albrecht-Dürer-Gymnasium in Berlin;
Drogisten- ausbildung	Herbst 1959 bis Ostern 1962; anschließend ein halbes Jahr lang als Drogist tätig gewesen;
Zweiter Bildungsweg	Herbst 1962 bis Ostern 1964; Abitur beim Senator für Schulwesen in Berlin;
Pharmazeutisches Praktikum	Ostern 1964 bis Ostern 1966;
Vorexamen	Ostern 1966;
Staatsexamen	Oktober 1969;
Doktorarbeit	seit 1.1.1970



DIFO-DRUCK SCHMACHT - BAMBERG RUF:62216